

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE
L'ALEXINEMIE HUMAINE

THESE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTÉ
DE PHARMACIE LE 4 JUILLET 1953

PAR

M^{me} MATHILDE CASTAY, née GAMBINI

PHARMACIEN

Attachée de Recherches, Assistante au Laboratoire de Biologie appliquée
et de Pharmacologie de l'Institut des Hautes Etudes de Tunis

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE « MENTION PHARMACIE »

JURY	{	MM. BESSIERE...	Professeur.	{	<i>Président.</i>
		MONNIER...	Professeur.		
		CARRERE...	Professeur à la Faculté de Médecine.		
		DIACONG...	Professeur à l'Institut des Hautes Etudes de Tunis.		<i>Assesseurs</i>

TUNIS

IMPRIMERIE BAYLE et C^{ie}

3, Rue de Lorraine

1953

Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

PERSONNEL ENSEIGNANT

MM.
CANAL (Et.), Professeur-Doyen.
JAULMES (Paul), Professeur.
DOLIQUE (Roger), Professeur.
GIROUX (Jean), Professeur.
GRANGER (Robert), Prof.-Asses-
seur.
CASTEL (Pierre), Professeur.
MONNIER (Pierre), Professeur.
SUSPLUGAS (Jean), Professeur.
BESSIERE (Clément), Professeur.

CHAIRES

Physique.
Chimie analytique et Toxicologie.
Chimie minérale et Pharmacie Ind.
Phar. Galénique et Pharmacodynam.
Chimie Organique pharmaceutique.

Pharmacie chimique.
Chimie biologique.
Botanique et Matière médicale.
Zoologie et Microbiologie.

MAITRES DE CONFERENCES

M^{me} HOLLANDE (Germaine). Sciences naturelles.
MARIGNAN (Roger). Sciences physico-chimiques.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES ET CONFERENCES

CANALS (E.), Professeur-Doyen.	Hydrologie.
JAULMES (P.), Professeur.	Toxicologie et C. ES. Bromatologie.
DOLIQUE (R.), Professeur.	Pharmacie industrielle.
GIROUX (J.), Professeur.	Pharmacodynamie.
GRANGER (R.), Profess.-Assesseur.	{ Chimie physique. Physiologie et C. E. S. de Chimie biologique. Botanique, Cryptogamie et C. E. S. microbiologie. Zoologie et C. E. S. Microbiologie.
MARIGNAN (R.), Maître de Conf.	
MONNIER (P.), Professeur.	
MARIGNAN (R.), Maître de Conf.	
SUSPLUGAS (J.), Professeur.	
BESSIERE (C.), Professeur.	Hygiène.
MARIGNAN (R.), Maître de Conf.	Législation et Déontologie.
ASTRUC (L.), Chargé de Cours.	Sérologie.
DIACONO (H.), Chargé de Cours.	

CHEFS DE TRAVAUX

LALAUURIE (Marc).	Histoire naturelle.
LIQUIERE (Georges).	Chimie.
MESTRES (Robert).	Chimie.
Mlle BARDET (Lucette).	Physique.
HUGUET (Robètr).	Histoire naturelle.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. A. ASTRUC, Doyen.
MOUSSERON, FAUCON, HOLLANDE, Professeurs.

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. FARRE



ERRATA

- Page 5, ligne 21, lire rappellerons, **au lieu de** rappelerons.
- 7, ligne 23, lire globule rouge-anticorps, **au lieu de** globule rouge-anti-corps.
- 20, ligne 18, lire JONSEN, **au lieu de** JOSEN.
- 25, lignes 11 et 14, lire Co + + +, **au lieu de** Co + +.
- 28, ligne 11, lire liée, **au lieu de** lié.
- 33, lignes 31 et 33, lire sensibilisatrice, **au lieu de** sensibilatrice.
- 38, ligne 5, lire N4/N37, **au lieu de** N4 N37.
- 41, ligne 30, lire malgré, **au lieu de** magré.
- 43, ligne 14, lire HODGKIN, **au lieu de** HOGKINGS.
- 53, ligne 17, lire il, **au lieu de** li.
- 54, ligne 1, lire isolipoïdique, **au lieu de** isolipolidique.
- 57, ligne 14, lire hémolytique, **au lieu de** hémolitique.
- 60, la 30 ième ligne devient la 31 ième, la 31 ième ligne devient la 30 ième.
- 61, ligne 6, lire glacière, **au lieu de** glaciaire.
- 76, ligne 19, lire ne, **au lieu de** se.
- 96, ligne 1, lire rapports, **au lieu de** rapportées.
- 103, ligne 13, lire augmentée, **au lieu de** augmenté.
- 130, ligne 21, ponctuer un point **au lieu de** deux points.
- 139, ligne 29, lire vitamine E, **au lieu de** vitamine K.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BESSIERE,
Professeur à la Faculté de Pharmacie

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette
thèse.

En témoignage de respectueuse reconnaissance.

A NOS JUGES,

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONNIER,
Professeur à la Faculté de Pharmacie.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CARRERE,
Professeur à la Faculté de Médecine,

pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre
jury de thèse.

A MON MAITRE, LE PROFESSEUR H. DIACONO,

Membre correspondant de l'Académie de Médecine,

Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie,

Chargé de cours à la Faculté de Pharmacie de Montpellier,

Professeur à l'Institut des Hautes Etudes de Tunis,

qui a inspiré, orienté ce travail et consacré de longues heures à sa discussion et à sa mise au point.

Aucun mot ne saurait traduire toute la reconnaissance, toute l'admiration, tout l'enthousiasme que nous éprouvons à son égard.

Nous le prions de trouver ici l'expression de nos remerciements les plus vifs et celle d'une immense et respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GIBERTON,
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Alger

ET

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GRANGAUD,
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Alger
en témoignage de respectueuse reconnaissance.

AU DOCTEUR GEORGES DIACONO,
en témoignage de notre gratitude

A TOUS CEUX QUI NOUS ONT APPORTÉ LEUR APPUI
DANS LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE:

CARACTERES ESSENTIELS DE L'ALEXINE	5
I. — Bref historique de nos connaissances	5
II. — Les composants de l'alexine	10
Les composants C'1, C'2, C'3 et C'4.	
Réactivation des sérums inactivés spécifiquement et titrage des composants du complément.	
III. — Le complément des différentes espèces animales.....	18
VI. — Influence des divers agents sur l'alexine.....	21
1° agents physiques (température, vieillissement, radiations, ultrasons, pression).	
2° agents chimiques (colorants, dilution, chlorure de sodium, acides et alcalis, cations et Mg^{++} , citrate de sodium et sels précipitant le calcium, autres substances inhibitrices).	
3° agents biologiques (cholestérol, vitamines, hormones, acides aminés, sulfamides, antibiotiques).	
V. — Phénomènes où se manifeste l'alexine.....	30
Le phénomène hémolytique.	
La congutination..	
L'opsonisation.	
L'agglutininabilité.	
VI. — Anti-alexines. Effets anti-complémentaires.....	38
VII. — Origine de l'alexine	41
VIII. — Rôle physiologique de l'alexine	44
IX. — Alexine et coagulation	45

DEUXIEME PARTIE:

METHODES DE DOSAGE DE L'ALEXINE	51
I. — Principales méthodes de titrage de l'alexine.....	51
— Les éléments qui constituent tout système hémolytique	52
— Méthodes basées sur un système anti-homme (VARGUES, PECK et THOMAS)	61
— Méthodes basées sur un système anti-mouton (MEERS-EMAN, RANQUE)	64
— Bases de la détermination de l'unité 50 %.....	68

11. — Détermination de l'alexinémie humaine par utilisation du sérum de cobaye anti-globules rouges humains	77
— Matériel expérimental	79
— Détermination de l'unité d'hémolyse totale (protocole opératoire).	83
— Détermination de l'unité 50 % (protocole opératoire)	86
— Etude analytique des facteurs qui influencent la réaction d'hémolyse	89

TROISIEME PARTIE:

LES VARIATIONS PATHOLOGIQUES DE L'ALEXINEMIE...	101
1° L'alexinémie dans la tuberculose	102
2° L'alexinémie dans les maladies à protozoaires, en particulier dans le paludisme	105
3° L'alexinémie dans les maladies à virus, en particulier dans le trachome	108
4° L'alexinémie dans les affections hépatiques.....	109
5° L'alexinémie dans les états anaphylactiques	110
6° L'alexinémie et la protidémie	112

QUATRIEME PARTIE:

ESSAIS EXPERIMENTAUX	115
A. — Action de l'héparine	115
B. — Action du tromexane	122
CONCLUSIONS GENERALES	129
BIBLIOGRAPHIE	133

PREMIERE PARTIE

CARACTERES ESSENTIELS DE L'ALEXINE

I

BREF HISTORIQUE DE NOS CONNAISSANCES

S'ils ne nous permettent pas encore de donner une définition rigoureuse de l'alexine, les travaux de ces dernières années ont élargi notre connaissance de ce constituant complexe du sérum et l'ont retiré du « royaume du mythe » selon l'expression de ECKER (40).

Pendant longtemps, on considéra cette question du point de vue de l'immunologie et les nombreuses recherches entreprises, qui permirent sans doute d'établir la constitution de l'alexine, aboutirent à des résultats d'ordre qualitatif.

Ces dernières années, les progrès de la microchimie, particulièrement dans le domaine des protéines, ont permis d'isoler à un état voisin de la pureté et de titrer quantitativement certains composants de l'alexine. Avec les recherches de ECKER et ses collaborateurs d'une part, et de HEIDELBERGER et MAYER d'autre part, nous en arrivons à considérer le complément comme un vrai problème de biochimie.

Nos premières connaissances sur le sujet que nous abordons, remontent à BUCHNER (19) qui désigna sous le nom d'alexine, le principe actif du sérum humain frais qui préside à la destruction des microbes ou des globules rouges. L'importance de ce constituant du sérum ne fut mise en évidence que quelques années plus tard par les travaux de BORDET. Nous ne nous appesantirons pas sur ces faits classiques; mais nous rappellerons que BORDET (15) reprenant l'étude de la bactériolyse établit de façon définitive le rôle de l'alexine.

En effet, on sait que dans le phénomène décrit par PFEIFFER, les vibrions cholériques, injectés dans la cavité péritonéale de cobayes immunisés, subissent une transformation granuleuse puis sont lysés. BORDET montra que la bactériolyse peut être reproduite *in vitro*, que le pouvoir bactériolytique d'un sérum humain disparaît après chauffage à 56°, et que ce pouvoir peut être restauré par l'addition de sérum

frais. Cette expérience mit en évidence la coopération de deux substances distinctes et indépendantes dans la bactériolyse : l'une, thermolabile détruite à 56°, non spécifique que BORDET assimila à l'alexine de BUCHNER, l'autre thermostable, spécifique, la sensibilisatrice produite par l'immunisation.

BORDET montra de même que l'hémolyse immunologique résulte aussi de l'action de l'alexine sur des globules rouges sensibilisés par un anticorps spécifique.

Ces bactéries ou ces hématies sensibilisées absorbent l'alexine et deviennent des réactifs permettant de détecter la présence ou l'absence d'alexine. Ceci est à la base des réactions de fixation, appliquées pour la première fois par BORDET et WASSERMAN au diagnostic de la syphilis.

C'est à BORDET que revient également le mérite d'avoir démontré l'intervention de l'alexine dans le pouvoir opsonique du sérum et dans le phénomène de congutination.

Dès lors, la fonction complémentaire du sérum est bien connue et son caractère essentiel « la thermolabilité » est mis en évidence. Il restait à définir la nature de l'alexine.

L'alexine est-elle une substance unique, une entité chimique ou bien, par sa fonction complémentaire correspond-elle à un équilibre colloïdal optimum du sérum ?

Dans la première hypothèse, EHRLICH et SACHS (41) attribuaient à la molécule d'alexine deux groupements bien distincts, l'un combinable qui préside à l'union de ce principe à l'antigène sensibilisé, l'autre fonctionnel qui incarne le pouvoir lytique. Cette idée ne s'est pas avérée satisfaisante car on ne peut dissocier l'aptitude à la fixation de la qualité lytique.

À l'origine, quelques auteurs avaient pensé à comparer l'alexine à un ferment. Mais, comme nous le verrons dans la suite, on ne peut assimiler le phénomène de lyse à une hydrolyse de protéines ou de lipides.

D'autre part, on s'est préoccupé de savoir à quel groupe de constituants du sérum pouvait appartenir l'alexine. Il ne semble pas qu'il faille la comprendre dans le groupe des lipides (KOSSOVITCH) (67). En effet, LIEFMAN et COHN (73) ont bien montré que les substances extractibles à 0° par l'alcool et l'éther ne possédaient pas les propriétés de l'alexine.

Mais la sensibilité de ce corps à l'action des enzymes protéolytiques et aux agents dénaturants des protéines, en particulier à la température, fait plutôt penser à le classer parmi les protéines du sérum.

Nous avons déjà signalé que le caractère essentiel de l'alexine était sa thermolabilité : un sérum frais est inactivé si on le chauffe à 56° pendant une 1/2 heure, mais il retrouve ses propriétés complémentaires si on lui ajoute du sérum frais. Aussi certains auteurs ont-ils pensé qu'il n'y avait pas une substance complémentaire mais une fonction complémentaire correspondant à un équilibre optimum des protéines du sérum. Quand cet édifice est détruit, la fonction disparaît ; en effet, à la température d'inactivation, température critique selon LECOMTE DE NOUY (71), celui-ci a montré que les protéines subissaient de profondes modifications : le sérum atteint un minimum de viscosité, puis, au-dessus de cette température, sa viscosité et son opacité augmentent rapidement, l'hydratation des protéines devient irréversible avec augmentation des dimensions de leurs molécules.

Mais cette conception n'est pas satisfaisante car, comme nous le verrons, des composants thermostables entrent dans la constitution de l'alexine.

Pour MUIR (90) l'alexine est le « constituant fixable » du sérum frais. Cependant, certains composants nécessaires à la lyse ne se fixent pas sur le complexe globule rouge-anti-corps.

Ce sont certainement les résultats du fractionnement du complément qui permirent d'identifier des constituants d'une même substance responsable des divers aspects de l'activité complémentaire (bactériolyse, hémolyse, opsonisation et conglutination).

Le premier essai de fractionnement fut effectué par FERRATA en 1908 ; on peut le considérer comme fondamental car, si, par la suite, les différents chercheurs y ont apporté des modifications pour augmenter la sensibilité de la méthode et obtenir des produits de plus grande pureté, le même principe demeure à la base.

C'est ainsi que, si on dialyse du sérum frais de cobaye contre de l'eau distillée, on obtient un précipité contenant des globulines et un liquide surnageant contenant les albumines.

Le précipité redissous dans de l'eau physiologique ne possède plus d'activité complémentaire, de même que le liquide surnageant. Mais

les deux fractions mélangées sont de nouveau complémentaires si on les fait agir sur des hématies sensibilisées.

Ces faits confirment la position de l'alexine dans le groupe des protides et mettent en évidence deux fractions, l'une globulinique, l'autre albuminique.

L'expérience montra que la fraction globulinique se fixe en premier lieu aux hématies sensibilisées et on lui donna le nom de « chaînon intermédiaire » ou « moyen » ou « mid piece », tandis que la fraction albuminique qui ne peut se fixer au complexe globule-anticorps qu'après le chaînon intermédiaire, prit le nom de chaînon terminal ou « end piece ».

L'analyse de ces fractions par les méthodes modernes (électrophorèse et ultracentrifugation) a montré qu'elles n'étaient pas homogènes.

C'est ainsi que l'école de ECKER et PILLEMER caractérisa dans ces fractions les composants thermolabiles C'1 et C'2. En effet, parmi les globulines du chaînon moyen, on isola une globuline bien définie qui possède l'activité de C'1 ; tandis que dans la fraction dite albuminique, on mit en évidence une mucoeglobuline qui possède l'activité de C'2.

En pratique, on retrouve souvent, dans la littérature « chaînon moyen » pour parler de l'activité du composant C'1 et « chaînon terminal » pour le composant C'2.

L'expérimentation de diverses substances sur l'activité complémentaire, permet de mettre en évidence deux autres composants, thermostables.

Celui que l'on a appelé le troisième composant, C'3 selon la terminologie anglo-saxonne, fut étudié par l'école de SACHS qui montra que le venin de cobra inactivait le complément sans détruire les deux autres composants. De plus, le sérum ainsi inactivé retrouve son activité si on lui ajoute du sérum chauffé à 56°. Il s'agit donc bien d'un troisième composant distinct et thermostable.

Puis un quatrième composant fut décrit par GORDON, WHITHEAD et WORMALL (48) qui observèrent que le sérum traité par l'ammoniaque diluée était inactivé. Mais son activité est restituée si on lui ajoute du sérum, chauffé ou bien privé de C'3. Ceci montre que

l'ammoniaque diluée agit sur un quatrième composant différent des autres composants décrits, et thermostable.

Selon TODA et MITSUSE (124) le benzène inactive le sérum en détruisant un cinquième composant, doué d'une grande thermorésistance; mais les chercheurs n'ont pas confirmé cette hypothèse.

Le complément apparaît donc de nature complexe; l'activité complémentaire résultant de la coopération de quatre facteurs, les « composants », C'1, C'2, C'3, C'4, répartis dans les fractions protéiques du sérum, thermolabiles et thermostables. Ce point de vue a été confirmé par tous les chercheurs. Cependant, les techniques modernes d'analyse des protéines ont permis de fractionner les chaînons, de titrer les composants et, parfois, de les isoler à l'état de pureté, comme dans le cas de C'1.

Au cours de l'hémolyse, il est bien établi que trois composants se fixent sur les globules sensibilisés, suivant un ordre sélectif: C'4, C'1, C'2 tandis que C'3 agit comme catalyseur.

La même alexine est nécessaire au phénomène de conglutination et d'opsonisation. Dans l'opsonisation, ECKER et LOPEZ CASTRO (39) étudiant le rôle des divers composants ont montré que C'3 n'était pas nécessaire.

Enfin, HEIDELBERGER (56, 57) a appliqué à l'étude du complément, les critères quantitatifs de l'analyse des anticorps par la détermination de l'azote précipitable. On a pu mesurer ainsi, l'azote correspondant au complément: on prépare un mélange d'antigène (polysaccharide spécifique d'un type de pneumocoque) et du sérum immun correspondant. On y ajoute d'une part, du sérum frais (C) et, d'autre part, du sérum inactivé (iC). On détermine l'azote des précipités spécifiques et la différence entre l'azote trouvé entre C et iC correspondant à l'azote du complément.

Il semble que les précipités spécifiques fixent principalement C'1 et C'4. Primitivement, les essais ont été faits avec du sérum de cobaye et ont donné les valeurs de 0.04 à 0.06 mg par cm³.

HEIDELBERGER, analysant le sérum humain, a trouvé des valeurs analogues et a proposé une méthode de titrage basée sur une détermination d'azote.

Comme le fait remarquer ECKER dans une récente conférence (40), la difficulté de cette détermination n'a pas permis une application pratique.

Ainsi, durant ces dernières années, notre connaissance de la constitution de l'alexine a nettement progressé mais il reste encore à éclaircir le problème de la fixation du complément et des rapports entre anticorps et complément.

La tendance actuelle, avec les travaux de MAYER et de ses collaborateurs, est de considérer le phénomène hémolytique comme une réaction enzymatique dans laquelle l'anticorps joue le rôle de l'enzyme et où le complément est un facteur secondaire, utilisé dans le processus de l'hémolyse, vraisemblablement comme catalyseur.

II

LES COMPOSANTS DE L'ALEXINE

Nous avons cité, précédemment l'expérience de FERRATA et nous avons vu que le fractionnement par dialyse, dans des conditions bien déterminées, permettait d'obtenir deux fractions.

Ces « chaînons » moyen et terminal, isolés au cours du fractionnement ne sont pas des corps purs, si on les examine à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse.

Ainsi, le diagramme électrophorétique du chaînon moyen indique que celui-ci contient au moins 4 protéines distinctes.

De même, le chaînon terminal, ou fraction soi-disant albuminique, présente au moins 4 seuils dont l'un correspond à la globuline du sérum normal, d'après un travail de PILLEMER (102).

Dans le chaînon moyen ou mid-pièce, qui dans l'esprit de certains chercheurs est C'1, on retrouve toute l'activité de C'1, la plus grande partie de C'3 et une faible partie de C'4.

Dans le chaînon terminal, on retrouve tout C'2, la majeure partie de C'4 et un peu de C'3.

LE COMPOSANT C'1

Ce composant est le seul composant du complément qui ait été isolé à l'état de pureté : il présente les caractères d'une euglobuline.

On l'obtient à partir du chaînon moyen, lequel se sépare quand on traite le sérum par de l'eau et du gaz carbonique ou bien par de l'eau légèrement acidifiée par l'acide chlorhydrique.

Pour séparer C'1 à l'état de pureté, on effectue une précipitation à basse température, avec du sulfate d'ammoniaque $M=1,4$.

Le précipité est soumis à des purifications successives et la dernière dialyse contre un tampon de phosphate à $\text{pH}=5,2$ et de force ionique $\mu=0,02$ fournit une euglobuline homogène.

La mobilité électrophorétique de celle-ci est de $2,9 \times 10^{-5}$ avec tampon $\mu=0,2$ et $\text{pH } 7,7$.

A l'ultracentrifugation, elle sédimente à la vitesse de $6,4 \times 10^{-13}$ unités Svedberg.

Cette fraction représente 0,6 % des protéines totales du sérum.

Ce composant a les caractères d'une globuline et est très sensible aux variations des conditions physico-chimiques.

Il n'est pas stable à pH neutre, mais son activité demeure à $\text{pH } 5,4$ 5,6.

Tous les chercheurs reconnaissent sa sensibilité à l'action de la chaleur : il est détruit en une demi-heure à 50° et presque instantanément à 60° .

MUTSAARS (91) a montré que C'1, lorsqu'il est fixé sur des globules rouges sensibilisés, résiste à l'action même prolongée d'une température qui l'inactive quand il est libre. Il se peut que C'1 absorbé à la surface des globules sensibilisés acquiert de ce fait une certaine thermorésistance.

Au cours de la réaction hémolytique, il se fixe sur les hématies sensibilisées, après C'4. On a montré qu'en l'absence de C'4, il était hémolytiquement inerte.

Les propriétés de ce composant sont groupées dans le tableau emprunté à PILLEMER (102).

TABLEAU I
Propriétés du Composant C'1

Mobilité électrophorétique, pH 7.7 $\mu=0,2$	$2,9 \times 10^{-5}$
S 1 % 20°	$6,4 \times 10^{-13}$
20	
Azote protéidique %	16,3
Glucides %	2,7
Phosphore %	0,1
Pouvoir rotatoire (α) $\frac{25^\circ}{D}$	— 28,7
Point isoélectrique apparent	5,2 5,4
Fraction de l'activité totale du complément %.....	100
Fraction des protéines du sérum %.....	0,6
Stabilité à la chaleur (activité détruite à la température de)	50°

LE COMPOSANT C'2

Celui-ci se retrouve dans le chaînon terminal, c'est-à-dire, dans la fraction du sérum qui reste en solution quand le sérum est traité par l'eau et l'acide carbonique ou l'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique. Ce chaînon est associé aux albumines du sérum.

On a pu obtenir une muco-euglobuline qui possède l'activité de C'2 et de C'4. Ces deux composants sont étroitement liés. Au point de vue chimique, ce sont des complexes, protéines-hydrates de carbone.

Le composant C'2 n'a pas été isolé à l'état de pureté; mais on obtient un produit très purifié, qui ne renferme que 3 % d'hydrates de carbone, au lieu de 10 % dans la muco-euglobuline du complément du cobaye, par précipitation à pH 6,8 avec sulfate d'ammonium $M=2,4$.

Ce composant est relativement plus stable que C'1, son activité se maintient plusieurs jours à 3 - 5°. Cependant il est inactivé si on le chauffe à 52° durant une demi-heure.

Comme C'1, il est détruit par les enzymes protéolytiques et les solvants organiques, mais il est plus résistant.

Au point de vue hémolytique, sa présence est essentielle. Il se fixe sur les hématies sensibilisées, après C'1.

Dans le complément humain, c'est le composant présent au titre le plus faible et, d'après les travaux de BIER (13), c'est lui qui « limite » le titre du complément humain. C'est ce que les auteurs anglo-saxons appellent le « limiting component ». Dans le sérum de cobaye, le composant qui limite le titre du complément est le composant C'3.

TABLEAU 2

*Propriétés d'une muco-globuline possédant l'activité
de C'2 et de C'4 (PILLEMER, 102)*

Mobilité électrophorétique, pH 7,7 - 7,8	$4,2 \times 10^{-5}$
Point isoélectrique apparent	6,4
Pouvoir rotatoire (α) $^{25^\circ}_D$	$-192^\circ,6$
Azote protéidique %	14,2
Phosphore %	0,1
Glucides %	10,3
Activité détruite en 30 minutes à la température de..	50° (C'2) 66° (C'4)
Fraction de l'activité totale du complément %.....	85
Fraction des protéides totaux %.....	0,18

LE COMPOSANT C'3

Un troisième composant a été identifié dans le sérum par l'action destructive du venin de cobra et de la levure de bière. On a montré que le facteur anticomplémentaire de la levure était la fraction insoluble, constituée essentiellement d'hydrate de carbone. C'est ce qu'on nomme le zymosan.

De même le formol se comporte comme un agent inactivant.

NATHAN (93) a montré que le venin de cobra et la levure de bière, agents de destruction du C'3 de l'alexine, sont incapables de détruire ce même composant quand l'alexine a été chauffée à 56° .

MUTSAARS (92), travaillant sur ce sujet, a constaté que l'alexine fraîche sensibilise le sérum chauffé à l'action du venin de cobra. Mais ce facteur adjuvant ne peut s'identifier avec aucun des composants de l'alexine.

Au point de vue chimique, C'3 est un phospho-lipide. Il n'a pu être isolé à l'état de pureté : au cours du fractionnement par le sulfate d'ammonium, on le retrouve en faible quantité dans toutes les fractions. Connue comme composant thermostable, il résiste à la température d'inactivation de 56°, mais il est détruit à 62°.

Les solutions hypertoniques le protègent : il devient plus résistant à la conservation et ne peut être inhibé par le zymosan en présence de 5 % de chlorure de sodium.

La présence de ce composant est essentielle pour que l'hémolyse se produise, bien que lui-même ne se fixe pas sur l'agrégal globule-anticorps. Il agit absolument comme un catalyseur. Après l'hémolyse, on le retrouve dans le liquide ambiant.

LE COMPOSANT C'4

Nous avons vu que GORDON, WHITCHEAD et WORMALL (48) avaient montré l'action destructrice de l'ammoniaque sur ce composant.

De même, les amines primaires et l'hydrazine se comportent comme des substances inactivantes.

Cette action n'est pas due à l'alcalinité mais elle est bien spécifique. On a émis l'hypothèse que l'ammoniaque agissait sur le groupement carbonyle en le convertissant en un autre, beaucoup moins actif.

Plus tard, l'action destructive, spécifique de ce composant, du venin de vipère fut étudiée par BIER (13) et confirmée par TODA et MITSUSE (124).

C'4 n'est pas dialysable. Relativement thermostable, il conserve son activité après le chauffage de 1/2 heure à 56°, mais il ne résiste pas à 65° pendant quelques minutes.

Ce composant est étroitement associé au composant C'2 dans la muco-euglobuline du sérum.

Ce n'est ni un lipide ni un composé associé aux lipides du sérum, comme l'avaient montré TODA et MITSUSE (124) en se basant sur l'action inactivante des solvants des lipides : éther, benzène et chloroforme.

PILLEMER et ses collaborateurs (100) ont mis en évidence que cette inactivation n'était pas spécifique et portait sur tout le complément.

Dans un récent travail, GORDON (49) a montré que l'ammoniaque inactive le complément d'un sérum traité par de fortes concentrations de chlorure de sodium de sorte qu'en diluant le sérum pour l'isotoniser, son activité n'est pas restaurée, bien qu'elle puisse l'être par l'addition de sérum chauffé.

RÉACTIVATION DES SÉRUMS INACTIVÉS SPÉCIFIQUEMENT

ET TITRAGE DES COMPOSANTS DU COMPLÉMENT

Il est possible de réactiver le complément de sérums inactivés spécifiquement. C'est ainsi que :

1° Les fractions solubles (E) et insolubles (M), obtenues par dialyse ou par dilution avec l'eau, sont inactives seules, mais l'activité est restaurée par reconstitution du mélange.

2° Le complément traité par la levure ou le zymosan (Z) et le complément traité par l'ammoniaque (N) sont inactifs, si on les teste séparément, mais la combinaison de Z et de N est active.

3° Le complément chauffé à 56° pendant 20 mn (H) seul est inactif mais on obtient une hémolyse par combinaison avec Z ou N. Donc le sérum chauffé contient les composants qui sont détruits par le zymosan et l'ammoniaque, C'3 et C'4.

4° Le sérum chauffé, combiné à M ou E seulement, est inactif. Donc le sérum chauffé ne contient pas C'1 et C'2. Il en résulte également que les composants détruits par le zymosan ou l'ammoniaque, C'3 et C'4 sont différents de C'1 et de C'2, facteurs qui sont séparés quand le complément est scindé en M et E.

Ces faits sont illustrés par la figure 1, empruntée à KABAT et MAYER (62).

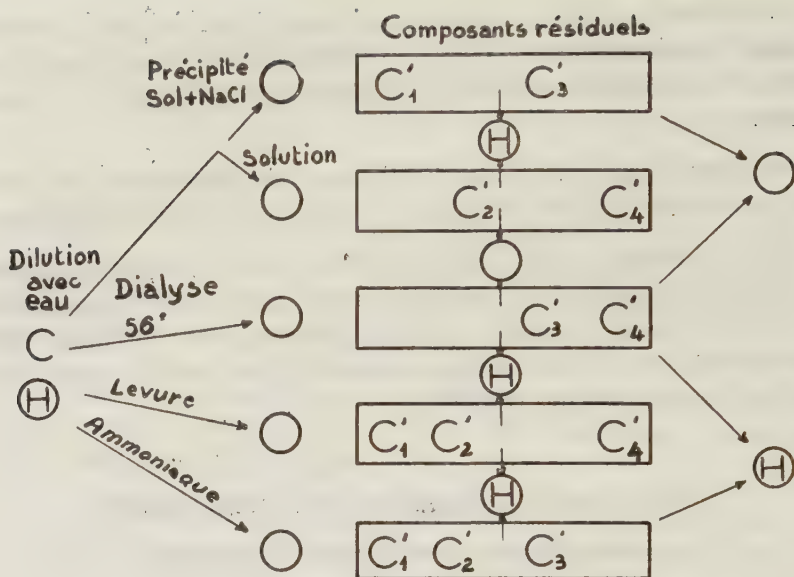


Figure 1

Interrelations du complément et des composants.

Les composants donnant l'hémolyse sont désignés par la lettre H.

Les fractions insolubles (M) et solubles (E), le complément traité par le zymosan (Z) et le complément traité par l'ammoniaque (N) peuvent être utilisés comme réactifs pour tester les composants manquants.

Par exemple, si une solution inconnue, ne possédant pas d'activité quand on l'utilise seule, active le complément traité par le zymosan (Z), c'est qu'elle fournit C'3 qui fait défaut dans (Z). Ainsi, (Z) peut servir à détecter C'3.

De même, (N) est un réactif pour C'4, (M) peut être utilisé pour détecter C'2 et (E) démontrera la présence de C'1.

De cette manière, on peut montrer que (M) contient C'1, C'3 et un peu de C'4; (E) contient C'2, un peu de C'3 et beaucoup de C'4.

(Z) contient C'1, C'2 et C'4 et (N) contient C'1, C'2 et C'3.

Etant donné que C^3 existe dans (M) , tandis que la plus grande

partie de C'4 se trouve dans (E), (M) et (E) ont été représentés dans la figure contenant respectivement, l'un C'1 et C'3, l'autre C'2 et C'4.

Les titrages des quatre composants dans le complément, ou dans les fractions du complément, peuvent être effectués à l'aide des réactifs M, E, Z, N et H.

Le titre du complément complet ou d'un mélange de composants est fonction du composant présent au titre le plus bas, ou « composant limitant » suivant HEGEDUS et GREINER (55) et BIER (13).

Pour déterminer le titre d'un composant d'un mélange inconnu, il est seulement nécessaire d'ajouter un réactif qui ne contient pas le composant à titrer, mais qui apporte un excès des trois autres composants : de cette manière, le composant en question devient le composant limitant » dans le mélange. On prend comme titre du mélange, le titre du composant cherché.

C'est ainsi que BIER et ses collaborateurs (13) ont déterminé le titre des 4 composants dans le sérum humain et dans le sérum de cobaye purs, dans le chaînon moyen et dans le chaînon terminal, dans les compléments inactivés spécifiquement et dans le sérum chauffé.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant. (p. 18).

Il est établi que C'3 est ordinairement présent au titre le plus bas dans le complément de cobaye, mais que C'2 n'est guère plus élevé.

C'3 est donc le composant limitant du complément de cobaye.

Le titre du complément humain est limité par C'2 et le titre C'3 est un peu plus élevé que celui de C'2. C'1 et C'4 ont à peu près le même titre dans le complément humain et dans le complément de cobaye.

TABLEAU 3

*Composition moyenne du complément pur et fractionné,
et du complément inactivé spécifiquement.*

	Unités par cm3				
	C' pur	C'1	C'2	C'3	C'4
Cobaye C'	350	2.300	450	370	6.000
— M (par dialyse)..		350	0	120	100
— M (par dilution)		—	0	100	—
— E (par dialyse).		0	140	60	3.500
— E (par dilution)		0	220	60	2.100
— Z		1.000	260	0	2.000
— N		1.200	300	100	0
— H		0	0	210	500
Humain C'	100	3.700	170	250	4.000
— M (par dialyse).		1.000	0	90	350
— M (par dilution,		1.000	0	40	130
— E (par dialyse).		0	110	35	2.400
— E (par dilution)		0	115	45	2.400
— Z		2.000	100	0	2.000
— N		2.000	—	—	0
— H		0	0	—	600

III

LE COMPLEMENT DE DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

L'activité complémentaire des sérums est connue depuis longtemps et l'on a constaté aussi, en particulier dans l'hémolyse, des différences dans leur comportement.

Ces dernières années, les auteurs ont titré les composants du complément des divers sérums animaux : cobaye, lapin, mouton, cheval... On trouve dans la littérature des chiffres qui diffèrent du fait de la diversité des méthodes employées.

Sur ce sujet, nous avons eu recours à l'abondante revue de RICE (C.E.) (107). Nous étudierons en premier lieu, le complément particu-

lièrement bien élucidé de cobaye qui se rapproche le plus de celui de l'homme.

Complément de cobaye

Le sérum de cobaye est la source la plus employée de complément dans les réactions de fixation.

Comme l'alexine humaine, l'alexine de cobaye est un complexe de quatre composants C'1, C'2, C'3, C'4, de nature identique à celle des composants du complément humain. On peut les séparer par fractionnement, comme pour le sérum humain, avec de légères variantes dans le mode opératoire.

Les composants diffèrent quelque peu dans leur résistance à la chaleur, aux acides et bases et à la concentration en sels.

Pour inactiver C'4, il faut faire agir l'ammoniaque 1 heure à 1 heure et demie de plus que pour le sérum humain.

Il est à noter que, dans le complément de cobaye, le composant C'4 est étroitement associé à C'2, au point de le considérer comme un groupement prosthétique, tandis que, dans le sérum humain, on le retrouve dans le chaînon moyen et dans le chaînon terminal.

En mesurant la quantité d'azote du complément ajouté aux précipités spécifiques antigène-anticorps, HEIDELBERGER et MAYER (56, 57) ont trouvé qu'elle est du même ordre de grandeur que pour le sérum humain.

Au point de vue hémolytique, le complément de cobaye a un titre supérieur à celui du complément humain. Les auteurs donnent des valeurs 4 à 8 fois supérieures.

Quant à l'interchangeabilité des composants, ECKER, PILLEMER et SEIFTER (36) ont montré que, seul le composant C'3 est interchangeable. C'1 et C'4 humains peuvent remplacer C'1 et C'4 de cobaye, mais C'1 et C'4 de cobaye ne peuvent remplacer effectivement C'1 et C'4 humains.

De plus, C'2 humain ne peut remplacer C'2 de cobaye et celui de cobaye ne peut remplacer celui de l'homme.

Dans un plus récent travail, BIER (13) et ses collaborateurs indiquent que les composants des deux compléments peuvent se substituer mutuellement, si on prend soin d'utiliser des concentrations convenables.

Chez le *lapin*, le complément est aussi constitué des 4 composants C'1, C'2, C'3, C'4. Leur séparation nécessite une technique un peu spéciale.

Sa valeur hémolytique est plus faible que celle du cobaye et de l'homme.

Le complément de *bœuf* est classé comme non hémolytique par suite d'un manque de C'2 et C'4.

De même, le complément de cheval n'est pas hémolytique mais les deux sérums, de bœuf et de cheval, coopèrent dans la congutination, pour agglutiner puis lyser les globules de mouton.

Dans le complément de *chèvre*, les 4 composants n'ont pas pu être caractérisés. Mais le sérum de chèvre possède un pouvoir opsonique élevé.

Le complément de *porc* est hémolytiquement actif. En particulier, HEGEDUS et GREINER (55) trouvent, dans le titrage des 4 composants une valeur très importante pour C'3 : 800, 100, 12,500, 50 unités respectivement pour les 4 composants.

Dans un travail récent, JOSEN, MANSKI et HEIDELBERGER (60) ont cherché à isoler C'3, à l'état de pureté, pour l'utiliser comme réactif dans le titrage des composants du complément des diverses espèces. La méthode qu'ils préconisent permet d'obtenir une fraction très riche en C'3, homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation.

Le complément de *rat* possède un titre hémolytique voisin de celui de l'homme.

Dans son étude sérologique de l'infection expérimentale du rat blanc par *Plasmodium berghei*, VARGUES (129) trouve que le complément du rat est 20 fois moins actif que celui du cobaye.

Le sérum de *souris* n'est pas hémolytique, par manque de C'2; en effet, le mélange de ce sérum avec le composant C'2 de cobaye est hémolytique.

Le complément de *mouton* est inactif dans le système hémolytique standard, mais il hémolyse les hématies humaines sensibilisées par des antisérums provenant du lapin ou du cobaye.

Ce sérum possède des propriétés opsoniques élevées pour le *Staphylocoque doré*.

Tous ces résultats ont été obtenus en se basant sur le phénomène hémolytique, en particulier du système globules rouges de mouton sensibilisés par un antisérum fourni par le lapin. Comme le fait remarquer C. E. RICE, cela limite notre connaissance des divers compléments et il est nécessaire d'utiliser d'autres tests, tels que la congglutination ou un autre système hémolytique.

C'est ainsi que dans sa dernière publication (110), l'auteur montre que, en utilisant non pas le système hémolytique « globules rouges de mouton — antisérum lapin » mais « globules rouges lapin - anti-sérum mouton », les compléments de cheval, de bœuf et de mouton, considérés comme non hémolytiques vis-à-vis du premier système, l'étaient vis-à-vis du second. Et on a pu mettre en évidence quatre composants analogues à ceux des autres espèces.

Nous voyons donc que notre connaissance du complément des différentes espèces animales s'étend, mais le problème de l'interchangeabilité des composants est encore à l'étude et reste obscur du fait de la complexité des phénomènes dans lesquels se manifeste l'alexine et de l'interférence des facteurs (actions inhibitrices mal élucidées).

IV

INFLUENCE DES DIVERS AGENTS SUR L'ALEXINE

Nous envisagerons successivement l'action des agents physiques, chimiques et biologiques, *in vivo* et *in vitro*.

1° AGENTS PHYSIQUES

a) *Température.*

C'est un fait bien connu que le complément est très sensible à l'action de la chaleur.

À l'état congelé, on peut le conserver quelques semaines. Un nouveau procédé de conservation, mis au point par FLOSSDORF et MUDEL (42) donne d'excellents résultats : c'est la lyophilisation, qui consiste en une dessiccation du sérum congelé ; le produit obtenu est très soluble. Le complément lyophilisé peut se conserver plusieurs mois.

À la température de 6° C, l'activité complémentaire se maintient 48 heures et au bout de 11 à 13 jours, selon POHL et RUTSTEIN (103)

perd 44 % de son activité. La diminution d'activité est la même à 23-25° au bout de deux jours.

Aux températures plus élevées, la destruction est plus rapide; vers 40°, les composants thermolabiles sont plus au moins atteints et à 56° le sérum est inactivé, quoique les 3° et 4° composants ne soient pas détruits.

Nous avons signalé précédemment que, selon LECOMTE DE NOUY, à cette température critique, correspondaient des modifications de l'équilibre protéique. Ces modifications du sérum chauffé peuvent être à l'origine d'actions favorisantes. C'est ainsi que ROULIER (114) constate qu'un sérum, chauffé à 56° pendant 20 minutes, introduit dans un système hémolytique, a le plus souvent une action favorisante. On pense tout de suite à l'intervention du composant thermostable C'3. Pour ROULIER, il s'agit plutôt d'un facteur non spécifique dépendant de la nature colloïdale du sérum.

L'action de la température d'inactivation, dans les tests de fixation, a été bien étudiée par HAZEN (53): le sérum humain, chauffé à des températures variant de 53° à 63°, acquiert des propriétés qui influencent l'activité complémentaire. D'une part, quand le complément est incubé pendant 4 heures à 3 - 6° avec du sérum chauffé, la quantité de complément donnant une hémolyse à 50 % varie en sens inverse de la température d'inactivation.

D'autre part, l'activité hémolytique du complément en présence de sérums syphilitiques et d'antigène varie, directement avec la température d'inactivation de 53° à 55°, elle est maxima de 55° à 57° et varie en sens inverse de 57° à 63°.

b) *Vieillessement.*

Même à température peu élevée, au cours du vieillissement le sérum humain perd ses propriétés alexiques. Cette action semble indépendante de la température. Elle atteint d'ailleurs les constituants thermostables du complément.

En expérimentant notre technique, nous avons pu observer une perte de 1/3 de leur activité sur des sérums conservés au réfrigérateur après 6 jours et de 2/3 après 13 jours.

On constate dans la pratique, que le complément résiste mieux

si on conserve le sérum sur caillot à la température du réfrigérateur. Pour HECHT (54), ce fait vient de la présence du fibrinogène qui maintient l'état colloïdal du sérum. « La présence de fibrinogène dans le caillot semble agir comme un enzyme dans le ralentissement de l'effet du vieillissement. ».

c) *Radiations.*

Il est bien connu que le sérum perd ses propriétés complémentaires s'il est exposé aux radiations solaires ou s'il subit l'action des rayons ultraviolets.

d) *Ultrasons.*

L'alexine est altérée par les ultrasons; sa fraction albuminique étant plus sensible que sa fraction globulinique, selon un travail de VAN DER SCHRIECK (126).

e) *Pression.*

L'influence de la pression a été étudiée par différents auteurs: LUMIÈRE et COUTURIER (76) constataient qu'en exerçant une pression de 100 kg. par cm² sur un sérum, il se produisait, dans la première heure une forte augmentation du pouvoir alexique puis une diminution progressive jusqu'au taux initial.

Dans un récent travail, BORDET P. et CHOME N. (16), étudiant les propriétés du sérum humain soumis à de hautes pressions (5.000 kg. par cm² pendant une heure et demie), constatent en particulier le développement d'un pouvoir anti-alexique très prononcé. De même, un sérum « pressé » perd sa propriété de déclencher le choc anaphylactique chez le cobaye.

2° AGENTS CHIMIQUES

a) *Colorants.*

Les colorants se montrent des inhibiteurs du pouvoir complémentaire, quelle que soit leur nature chimique.

ECKER (40) a montré que le rouge congo inactivait le complément par suite de modifications dans l'absorption et non pas par suite d'un changement chimique.

b) Dilution.

Un caractère important de l'alexine est son hydrolabilité. On sait que le pouvoir alexique disparaît par dilution du sérum au moyen d'eau distillée.

L'effet de la dilution est déjà sensible à la température ordinaire; à 37°, cet effet destructeur se manifeste en 5 minutes.

Il semble que l'hydrolabilité de l'alexine est en relation avec l'état physico-chimique des globulines.

c) Chlorure de sodium.

Il est bien connu que le pouvoir lytique de l'alexine est favorisé par une concentration saline voisine de celle de la solution dite physiologique à 9 g. ‰ de chlorure de sodium.

Le véhicule utilisé dans les réactions d'hémolyse est toujours à base d'eau physiologique.

Les milieux hypertoniques se comportent comme préservateurs de l'activité complémentaire. Ainsi, les solutions conservatrices des différents auteurs sont toujours hypertoniques, que ce soit le procédé de RONCHÈSE :

chlorure de sodium.....	54 g.
eau distillée q.s.p.	1.000 cm ³
sunoxol	0,25 g.

ou la solution de MOUNIER :

acide borique	4 g.
fluorure de sodium	3 g.
chlorure de sodium	13 g.
eau distillée q.s.p.	100 cm ³

ECKER (37) signale qu'en présence de 10 % de chlorure de sodium, le zymosan n'a pas d'action destructrice.

D'après HECHT (54) l'addition de chlorure de sodium au sérum protège le chaînon intermédiaire.

d) *Acides et Alcalis.*

Les acides et les bases se comportent comme des inactivants. Au delà de pH 4,2 et de pH 10,1, l'activité complémentaire est nulle. Selon les chiffres donnés par ECKER (37), la zone optima se situe entre pH 6,1 et 8,8, c'est-à-dire, aux environs de la neutralité.

Des expériences entreprises *in vivo*, par ANDRINI et FALSETTI (3) permettent de constater qu'en provoquant, chez les sujets sains, un état d'acidose ou d'alcalose, on observe une diminution notable du pouvoir complémentaire.

e) *Cations et Magnésium en particulier.*

L'action des cations Ca^{++} , Mg^{++} , Ni^{+++} et Co^{++} a été particulièrement étudiée par MAYER, OSLER, BIER et HEIDELBERGER (80). Ces auteurs ont montré que ces ions étaient essentiels au phénomène lytique. Mais les ions Ni^{+++} , Co^{++} et Ca^{++} le sont à un degré moindre que le Mg^{++} , qui apparaît étroitement lié à l'activité hémolytique, agissant à des doses infimes de l'ordre du γ . En effet, à des doses de 50 à 100 γ , il se comporte comme un activant et protège contre l'action inhibitrice du citrate de sodium.

Cette action activante du Mg a été confirmée ensuite par MALTANER et ALMEIDA (77) dans une étude sur les effets du magnésium parallèlement dans l'hémolyse et dans la coagulation.

Si le calcium est indispensable à la coagulation, le magnésium ne l'est pas et ne peut le remplacer. Cependant les sels ionisés de magnésium se comportent aussi comme des activants de la coagulation.

Le mécanisme de l'effet spécialement activant de l'ion magnésium dans le phénomène hémolytique n'est pas élucidé. Dans le travail de MALTANER, on trouve l'idée que l'effet du Mg serait dû à un blocage du Ca par les phosphates du sérum et que le Ca agirait en déplaçant le Mg d'un complexe Mg citrate. L'idée du blocage des ions Ca peut trouver un appui dans le fait que les sels ionisés de Mg sont inactifs en l'absence de Ca dans la coagulation.

Nous avons mis à profit ces résultats et, dans notre protocole opératoire nous utilisons comme véhicule de l'eau salée renfermant 0,50 g. de sulfate de magnésium $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$, ce qui représente approximativement 100 γ d'ions Mg dans chaque tube à réaction.

f) *Citrate de sodium et sels précipitants le calcium.*

L'action inhibitrice des composés dont le sel de calcium est insoluble ou non ionisable, tels que les citrates, oxalates et fluorures est connue depuis longtemps. Les chercheurs ont associé cet effet à un blocage des ions Ca^{++} , qui, nous venons de le voir, sont essentiels au processus hémolytique.

Dans son travail sur l'hémolyse, H. DIACONO (28) a bien étudié ce problème et il conclut à un blocage des ions Ca^{++} puisqu'il suffit d'ajouter du chlorure de calcium dans un système hémolytique citraté pour neutraliser l'effet inhibiteur du citrate. Le phénomène paraît semblable à ce qui se passe dans la coagulation et cela représente un point de comparaison de l'hémolyse et de la coagulation sur lequel nous reviendrons plus loin.

Cependant, ce point de vue est discuté, et dans un récent travail, GENGOU (45, 46) reprend l'étude des effets du citrate de soude et, en déduit que l'inhibition de l'hémolyse est due à la formation de complexes citrate-agent hémolytique dépourvus de tout pouvoir d'adhésion aux globules.

Que ce soit par l'un ou l'autre de ces mécanismes, il n'en demeure pas moins que les citrates, oxalates et fluorures s'opposent à l'activité de l'alexine.

g) *Autres substances inhibitrices.*

Toutes les substances qui apportent un changement dans l'équilibre colloïdal du sérum se conduisent comme des inhibiteurs du pouvoir complémentaire : ainsi l'alcool, l'éther, le chloroforme.

D'autre part, l'alexine a une affinité d'absorption pour les substances colloïdales ou à l'état de particules très fines : pulpes d'organes broyées, hydrate de fer colloïdal, acide silicique, kaolin, oxyde de titane. ECKER (35) a étudié certains de ces absorbants pour se rendre compte sur quelle fraction du complément ils agissaient.

Ainsi le gel d'alumine, en faible quantité absorbe le chaînon moyen, mais en quantité plus grande, absorbe tout le complexe. Le zymosan, nous l'avons vu, enlève spécifiquement le composant C'3.

3° AGENTS BIOLOGIQUES

Nous rapportons dans ce chapitre des résultats sur l'influence de certaines substances biologiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

a) Cholestérol.

Nous avons pu vérifier, nous-mêmes, l'action inhibitrice connue du cholestérol, *in vitro* : si on ajoute dans un système hémolytique équilibré, quelques parcelles de cholestérol, l'hémolyse ne se produit pas.

Dans l'ouvrage qu'il consacre à l'hémolyse, DIACONO (28) a entrepris une série d'essais concernant cette question : vérifiant en particulier, que l'action du cholestérol se porte bien sur l'alexine, dans un système hémolytique.

Au sujet de l'effet du cholestérol *in vivo*, DIACONO a constaté que le sérum de cobayes anti-mouton, qui ont reçu des injections d'huile cholestérolée, conserve son pouvoir hémolytique.

Un travail plus récent de BERTOLI, PRATI et MANICARDI (11) étudie aussi l'effet du cholestérol : les auteurs soumettant des lapins à un régime riche en cholestérol, observent, à côté de lésions anatomo-pathologiques diverses, une hypercholestérolémie et une augmentation du pouvoir complémentaire. Mais les auteurs eux-mêmes ne pensent pas qu'il faille incriminer cette augmentation à l'hypercholestérolémie mais plutôt à des facteurs secondaires.

b) Vitamines.

L'activité de ces biocatalyseurs dans les processus de défense de l'organisme a conduit les chercheurs à étudier une répercussion possible des vitamines sur le pouvoir complémentaire. De façon générale, les résultats ne sont pas toujours concluants. On peut incriminer la méthode de dosage du complément qui n'est peut-être pas suffisamment sensible pour déceler des variations.

Nous citerons quelques travaux récents sur ce sujet.

Etudiant l'effet de fortes doses de vitamines D2 sur des sujets humains, BACCAREDDA (7) n'observe pas de variations significatives.

L'action de la vitamine E sur les réactions immunitaires a été étudiée par NIGRO (94) chez le cobaye. L'auteur ne constate de modifications ni sur le pouvoir complémentaire ni sur l'indice opsonique pour le bacille diphtérique.

Une même série d'essais est entreprise par NIGRO (95) au sujet de la vitamine K. Ce problème rejoint celui des rapports entre complément et coagulation que nous verrons plus loin. D'après l'expérience de NIGRO, le sérum des cobayes qui ont reçu une certaine

dose de vitamine K ne subit pas de modifications ni dans son comportement hémolytique ni dans son indice opsonique.

La grande activité du complexe B dans les métabolismes a suggéré de nombreux travaux. C'est ainsi que BACCAREDDA (7) signale une augmentation du pouvoir complémentaire dans l'hypervitaminose B. ANDRINI et CASTRIOTA (2) ont expérimenté la vitamine B2 et la vitamine B6 activement liées aux processus oxydo-réducteurs au niveau des cellules. La riboflavine ne semble pas avoir d'action alors que la *vitamine B6* augmente fortement l'activité complémentaire. Les auteurs posent le problème de savoir si cette influence n'est pas liée à la question de l'origine de l'alexine, en considérant soit l'action de la vitamine B6 sur la leucogénèse soit la stimulation du système réticulo-endothélial qu'elle provoque.

Les nombreux travaux axés sur l'influence de la *vitamine C* ont abouti aux mêmes résultats : l'acide ascorbique n'a pas d'action directe sur le complément. Il est bien certain que chez les animaux carencés, une diminution du pouvoir complémentaire doit accompagner l'affaiblissement de l'état général.

Dans une publication récente, BERNSTEIN (10) signale que l'acide ascorbique, à des doses physiologiques, *in vitro*, renforce l'action hémolytique du complément, mais a un effet inhibiteur à hautes doses.

c) Hormones.

Quelques chercheurs ont essayé de voir si les substances hormonales pouvaient influencer l'activité complémentaire du sérum.

Au sujet de la Thyroïde, on a observé depuis longtemps une élévation du pouvoir complémentaire chez les animaux hyperthyroïdiens, et de même, une suppression de ce même pouvoir après l'ablation de la thyroïde.

Les injections intraveineuses d'adrénaline provoquent une augmentation du pouvoir complémentaire. Selon ANDRINI et FALSETTI (3) cette augmentation est en rapport avec une stimulation du système réticulo-endothélial et, pour ces auteurs, ce fait est en faveur de l'origine histiocyttaire de l'alexine.

Il est intéressant de rapprocher ces données de la récente publi-

cation de DONZELOT et KAUFMANN (33) concernant l'héparine. Cette action activante de l'adrénaline pourrait être considérée comme un aspect de l'antagonisme héparine-adrénaline démontré par DONZELOT et KAUFMANN, car l'on sait et nous l'étudierons plus loin, que l'héparine est anticomplémentaire, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

On connaît aussi l'affaiblissement du pouvoir complémentaire dans le diabète. CANDELA et URGOITI (20) créant chez les chiens un diabète alloxanique, ont vérifié une diminution de l'activité complémentaire.

d) *Acides aminés.*

Un travail de STRANO (122) sur l'action de divers acides aminés conclut à un effet anticomplémentaire suivant la dose employée. Ce qui expliquerait que l'addition d'acides aminés puisse faire virer une réaction de WASSERMANN.

e) *Sulfamides.*

BERGONZINI (9) expérimentant le Protonsil sur les anticorps et le complément, constate que, *in vitro*, l'activité complémentaire n'est pas atteinte par le sulfamide.

f) *Antibiotiques.*

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature beaucoup de travaux sur ce sujet, en dehors d'une étude de l'influence de la streptomycine.

PAOLA et GEMMI (98) les premiers ont étudié l'action de la streptomycine chez les tuberculeux et ont observé une augmentation du pouvoir complémentaire. Les auteurs eux-mêmes remarquent que cette activation peut être due à une action générale des phénomènes de défense.

Dans le but de discriminer si c'est bien le complément qui est exalté par la streptomycine, MICHELE et PORTELLA (86) ont entrepris une série de travaux : ils opèrent sur des lapins normaux auxquels ils injectent l'antibiotique. On n'observe aucune modification du pouvoir alexique.

Les auteurs pensent que la streptomycine aide les mécanismes humoraux à redevenir normaux seulement chez les sujets atteints d'affections morbides.

V

PHENOMENES OU SE MANIFESTE L'ALEXINE

Nous connaissons, maintenant, la constitution du complément, nous allons passer en revue les différentes manifestations de ce complexe de constituants du sérum qui amène la lyse des globules rouges, immobilise les spirochètes, tue certaines bactéries gram— et qui provoque l'opsonisation de certaines bactéries, toutes ces fonctions nécessitant une coopération des anticorps pour entourer les cellules, tel que le définit HEIDELBERGER dans une récente conférence.

LE PHÉNOMÈNE HÉMOLYTIQUE

L'hémolyse immunologique est certainement la manifestation la plus connue de la présence de complément dans le sérum.

C'est à BORDET que revient le mérite d'avoir démontré que le pouvoir lytique pouvait s'exercer sur d'autres antigènes que le vibrion cholérique et les bactéries, en particulier, sur les hématies.

En effet, les globules rouges, lorsqu'ils sont sensibilisés par les anticorps spécifiques, sont lysés par le complément.

L'anticorps spécifique ou hémolysine a pris le nom de sensibilisatrice, puisqu'elle sensibilise l'hématie à l'action lytique du complément. Sensibilisatrice et complément sont les deux agents indispensables au phénomène hémolytique, le premier étant spécifique et thermostable, le second non spécifique et thermolabile.

La sensibilisatrice est absorbée par les globules et ceux-ci la retiennent avec une ténacité telle qu'ils demeurent très sensibles à l'action complémentaire même après avoir subi plusieurs lavages à l'eau physiologique.

Il est bien établi que la propriété antigénique appartient au stroma : en particulier, l'injection de stroma à un animal d'espèce différente fait apparaître le pouvoir hémolytique du sérum.

Pour BORDET, le phénomène de la fixation était un phénomène d'absorption comparable selon lui « au dépôt d'une couleur sur un

objet solide plongé dans un bain ou au collage de ferments ou toxines par des précipités ou matières pulvérulentes telles que le noir animal, ou bien encore aux phénomènes d'agrégation mutuelle des particules de deux colloïdes. ».

On admet aujourd'hui que les antigènes et les anticorps peuvent être plurivalents et s'agréger par l'intermédiaire de forces polaires.

Le complément serait comme un complexe protidique possédant un ou plusieurs groupements capables de former des combinaisons lâches et dissociables avec un anticorps isolé, et peut-être avec des molécules d'antigène, mais pouvant former des combinaisons fermes, dissociables avec difficulté quand il est entouré par un grand nombre de molécules d'anticorps ou d'antigènes.

L'hémolyse serait possible pour un recouvrement limité de la surface globulaire. Des calculs basés sur les quantités pondérales d'azote ont permis à HEIDELBERGER d'établir que seul 0,01 à 0,3 % de la surface du globule rouge est recouvert.

Les hémolysines étant fixées, la surface type du complexe anti-sérum-globule change et quand elle est en contact avec les composants du complément, il se produit une combinaison solide. L'absorption des composants se fait suivant un ordre connu et défini, actuellement, ainsi : le composant C'4 se combine le premier, ou en même temps que C'1, l'activité hémolytique de C'1 étant subordonnée à la fixation de C'4, d'après les conceptions les plus modernes. PILLEMER (101), KOSOVITCH (66), RONDONI (113).

La quantité de C'1 fixée est déterminée par la quantité de C'4 présente : plus de C'4 est fixée par les hématies, moins de C'1 est nécessaire pour produire l'hémolyse et moins de C'1 est fixé par les globules rouges.

Le composant C'2 se fixe ensuite ; il est essentiel au processus hémolytique et, le titrage des composants du complément non hémolytique de divers sérums animaux, a permis de se rendre compte que ce caractère était dû à un manque de C'2.

Les hématies sont alors sensibles à l'action de C'3 et l'hémolyse en résulte. Il est établi de façon certaine, que C'3 n'est pas fixé et agit comme catalyseur. Cette idée d'une fonction enzymatique a été reprise par les auteurs anglo-saxons. Sans toutefois considérer,

le complément comme une protéase, comme on y avait pensé à l'origine, les auteurs ont été amenés à comparer l'hémolyse par immunsérum et complément comme un processus enzymatique.

En effet, d'une part, l'ion Mg^{++} , à des doses infinitésimales, se montre essentiel à l'hémolyse et en favorise le cours, de même qu'il est un activateur des réactions enzymatiques. Cette action favorisante, nous l'avons vu, a été particulièrement bien étudiée par MAYER et ses collaborateurs.

D'autre part, MAYER (80) a été frappé par le fait qu'il suffit de 50 molécules d'anticorps et de 20.000 molécules de complément pour hémolyser 1 hématie alors qu'il faut 10^9 molécules de substances hémolysantes, telles que les saponines.

Ces deux faits ont amené à considérer le phénomène hémolytique comme un système enzymatique. Des études sur la cinétique de l'hémolyse ont été entreprises par MAYER, CROFT et GRAY (82). Ces auteurs ont montré que la cinétique d'un système hémolytique contenant un excès d'anticorps et une dose limitée de complément était différent d'un système contenant une dose limitée d'anticorps et un excès de complément.

Quand le complément est en faible concentration et l'anticorps en excès, la lyse se produit en moins d'une heure à 37° , probablement par suite de l'épuisement du complément tandis que, quand le complément est un excès et l'anticorps en quantité limitée, la réaction se poursuit lentement sans que la lyse soit complète. La courbe de la réaction présente l'allure d'une réaction enzymatique et MAYER et ses collaborateurs, ont conclu que l'anticorps se comportait comme un enzyme et le complément comme un facteur secondaire, peut-être comme un catalyseur.

Ces études du rapport entre anticorps et alexine ont été poursuivies par d'autres chercheurs. Ainsi MORRIS (89) est en accord avec MAYER pour constater une différence dans l'hémolyse de globules rouges sensibilisés par une dose optima d'anticorps et de globules rouges faiblement sensibilisés. Mais cet auteur explique le phénomène par une hétérogénéité des globules rouges, c'est-à-dire par une variation dans la réponse des hématies sensibilisées à l'effet lytique du complément due probablement à une quantité variable de molécules d'anticorps fixées sur chaque globule.

Dans un travail récent, BOWMAN, MAYER et RAPP (17) reprennent ce problème et démontrent que le caractère enzymatique de la réaction est dû à la réversibilité du complexe globule rouge-anticorps.

Les molécules d'anticorps peuvent se dissocier d'hématies intactes (complexe SA) ou d'hématies lysées (complexe S' AC' i). Ainsi, l'anticorps se transférant de globule à globule, l'hémolyse se produira tant qu'il y aura du complément disponible.

Cette aptitude des immunosérums à montrer un transfert d'anticorps est très variable, probablement en rapport avec le lien plus ou moins fort qui unit anticorps et globule.

A l'aide de calculs mathématiques, ALBERTY et DALDWIN (1) arrivent à ce résultat : que les points représentatifs des pourcentages d'hémolyse en fonction de la concentration en complément, se trouvent sur une courbe en forme de S, *même si toutes les cellules sont identiques par rapport à leur sensibilité au complément.*

Il semble bien que les travaux actuels s'orientent vers une expression mathématique des relations entre complément, globule et hémolysines dans l'hémolyse immunologique.

COMPLÉMENT ET CONGLUTINATION

Le phénomène de la congglutination a été rencontré et élucidé par BORDET et GRAY. Le fait est le suivant : quand on mélange des globules rouges de cobaye avec du sérum frais de bœuf, ils s'agglutinent puis ils s'hémo lysent. Si le sérum de bœuf a été chauffé à 56° durant une 1/2 heure, rien ne se produit ; le sérum frais de cheval, alexique, n'hémolyse pas les globules rouges de cobaye, mais le mélange de sérum chauffé de bœuf et de sérum frais de cheval se montre actif et provoque le phénomène de la congglutination.

Avant de se lyser, les globules s'agglomèrent en paquets très volumineux. Ce phénomène est dû à l'action d'une substance de nature colloïdale, fournie par le sérum de bœuf, la « congglutine », qui agit sur le complexe hématie-sensibilatrice-complément, l'agglomère et entraîne l'hémolyse. La congglutination ne peut se produire que grâce à la coopération sensibilatrice-alexique-congglutine.

La nature de la congglutine que l'on rencontre dans le sérum de bœuf et d'autres ruminants (antilope) n'est pas bien connue.

On a pensé que ce serait un composant de l'alexine mais la conglutine résiste au chauffage à 56°. Elle se distingue, de plus, des agglutinines du fait qu'elle nécessite la présence d'alexine pour agglutiner les globules et donner des flocons beaucoup plus gros que dans l'agglutination ordinaire.

En poursuivant l'étude de ce phénomène, STRENG (123) a pu montrer qu'en dehors des globules rouges, les microbes sensibilisés et ayant absorbé de l'alexine peuvent être conglutinés. De là, la mise au point d'un test de conglutination de même qu'on connaît le test de fixation du complément. Ce test n'a pas connu l'extension du précédent. Mais ces dernières années, il semble revenir à l'actualité. HOLE et COOMBS (59) pensent que ce test est plus sensible que le phénomène d'hémolyse pour détecter des anticorps dans certains cas, en particulier quand le système antigène-anticorps ne peut pas fixer le complément de cobaye.

RICE (109), dans un récent travail, reprend l'étude du complément de différentes espèces animales en se basant sur l'activité conglutinante. Cet auteur a trouvé que les compléments de cheval, de porc et de chat étaient très conglutinants. La fraction C'1 du complément de bœuf est la plus interchangeable et le mélange avec la fraction C'2 de beaucoup d'autres espèces a des propriétés conglutinantes.

Ce test, combiné à l'activité hémolytique, permet donc d'approfondir notre connaissance des composants du complément des espèces animales et leur interchangeabilité.

COMPLÉMENT ET OPSONISATION

Depuis de nombreuses années, il est établi que le sérum frais favorise la phagocytose par son pouvoir opsonisant.

Cette action favorisante se porte-t-elle sur le leucocyte pour stimuler son activité ou bien sur les bactéries pour les sensibiliser à l'attaque phagocytaire ?

Cette question a été résolue depuis les expériences de DENYS et LECLEF (27) sur la phagocytose du streptocoque : il est certain que l'action des immunsérums s'exerce bien sur les éléments bactériens qui sont sensibilisés à la phagocytose.

En effet, des microbes mis en contact avec l'immunsérum puis lavés par centrifugation à l'eau salée, deviennent très sensibles à la phagocytose. Au contraire, les leucocytes, placés tout d'abord dans le même antisérum, puis lavés par centrifugation, ne montrent aucun accroissement dans leur pouvoir d'englober les bactéries répondant à l'immunsérum mis en œuvre.

L'action opsonisante des sérums normaux se montre moins importante que celle des immunsérums.

De plus, lorsqu'on chauffe à 56° ou qu'on décomplémente un sérum normal d'une autre manière (vieillessement, addition de globules rouges sensibilisés), le sérum perd son pouvoir opsonisant. Ce fait a conduit à attribuer au complément un rôle important dans ce phénomène.

Cependant, dans le cas d'immunsérums, le pouvoir opsonisant n'est pratiquement pas atteint par la perte du complément.

Aussi WRIGHT et DOUGLAS (132) ont-ils désigné sous le nom de *opsonines* des principes actifs, non spécifiques et thermolabiles, ressemblant au complément.

Tandis que, dans le immunsérums, l'action sensibilisante à la phagocytose est spécifique et relativement thermostable, parce qu'elle est due à un anticorps, que l'on a identifié à l'anticorps O, le complément, s'il n'est pas indispensable, joue quand même un rôle favorisant [BOIVIN et DELAUNAY (14)].

Cependant actuellement, l'appellation de pouvoir opsonique n'est pas réservé au sérum normal, mais indique, aussi bien pour les sérums normaux que pour les immunsérums, le pouvoir sensibilisant à l'égard de la phagocytose, celui-ci provenant de la coopération de l'anticorps O et du complément.

Index opsonique.

Le pouvoir opsonisant se mesure par la détermination de l'index opsonique dont la technique initiale a été donnée par WRIGHT.

On recueille du sang sur citrate de sodium. On lave les globules par centrifugation et on prélève la couche supérieure du culot qui renferme les leucocytes. On prépare une suspension de leucocytes dans de l'eau physiologique.

On mélange les leucocytes avec une suspension de bactéries et avec du sérum normal, d'une part, et avec des bactéries et du sérum à étudier d'autre part. Ces mélanges introduits dans des pipettes capillaires et scellées sont maintenues à 37°, 15 à 20 mn.

Au bout de ce temps, on fait un frottis, on colore et on examine au microscope. On compte pour chaque mélange le nombre total de bactéries qui ont été englobées par les cent premiers leucocytes qu'on vient à rencontrer. Les chiffres obtenus sont les index phagocytaires. Leur rapport donne l'index opsonique.

Dans un travail récent, (1945) DELAUNAY A. et PAGES J. (24, 25) ont pu constater que le complément jouait un rôle important dans la physiologie du leucocyte. Leurs essais dans le rapport du complément et de la phagocytose ont abouti à ces résultats :

1° dans le cas d'immunsérum, il est bien établi que le pouvoir opsonisant se porte sur les *bactéries* pour les sensibiliser à la phagocytose. Ce pouvoir étant essentiellement dû à l'anticorps O, le complément est simplement utile.

2° dans le cas de sérums normaux, une notion nouvelle apparaît, celle de l'action directe du complément sur les *phagocytes*.

En effet, des polynucléaires de cobaye, placés dans du sérum frais de cobaye englobent rapidement des grains d'amidon, *in vitro*.

Cette phagocytose ne se produit plus si le sérum a été chauffé ou décomplémenté (action de l'ammoniaque, ou fixation spécifique).

De plus, on a vérifié que les grains d'amidon n'ont pas fixé de complément par le test hémolytique classique.

Cette propriété du complément de stimuler les phagocytes n'est qu'un aspect du rôle qu'il joue dans la physiologie du leucocyte, d'après les travaux de DELAUNAY et PAGES que nous rapportons plus loin.

Le rôle de différents composants du complément a été étudié, dans cet aspect de l'activité complémentaire.

D'après GORDON (50) trois constituants seulement C'1, C'2 et C'3 seraient indispensables pour la sensibilisation des bactéries à la phagocytose, C'4 n'étant pas nécessaire.

Dans un travail plus récent, ECKER et LOPEZ-CASTRO (39), étudiant l'oponine normale du sérum vis-à-vis du *micrococcus Candidus*, ont conclu que celle-ci était identique à la combinaison des trois composants C'1, C'2 et C'4; contrairement à GORDON, c'est le composant C'3 qui n'est pas nécessaire.

Les auteurs ont vérifié que l'opsonine du sérum frais était sensible aux mêmes influences que le complément (température, conservation, absorbants).

Le fait que C'3 n'est pas indispensable pourrait expliquer que, dans certains essais, on ne trouve pas de parallélisme entre le pouvoir opsonique et le titre hémolytique total, par exemple quand C'3 est le composant limitant comme dans le sérum humain.

ALEXINE ET AGGLUTINABILITÉ

Nous consacrerons quelques lignes à un autre aspect, du rôle de ce complexe qu'est le complément dans le milieu sérique.

Beaucoup d'auteurs ont signalé le rôle protecteur qu'il exerce.

C'est ainsi que DOLADILHE et ses collaborateurs (32) ont démontré que l'alexine stabilise les protéines sériques contre l'action déséquilibrante des agents précipitants. « Ce n'est que lorsque l'alexine a disparu complètement (par chauffage à 56° ou par vieillissement) que la fraction des protéines justiciable de ces agents précipitants, présente le maximum de sensibilité à leur action déséquilibrante ».

En particulier, il a été montré que le complément protège les hématies de l'isoagglutination et de l'immunagglutination.

ZERMATI, VARGUES et LÉVY (135), dans un travail sur l'agglutinabilité des hématies par les sérums antagonistes, ont constaté que la destruction du complément par la chaleur entraîne une augmentation du taux d'agglutinabilité.

Chez les splénomégaliqnes, quand les protéines et le complément sont normaux, le taux d'agglutinabilité est de 57 %, c'est-à-dire normal.

Mais quand ils présentent une hypoalexinémie et une hypoprotéinémie, le taux d'agglutinabilité est augmenté.

Dans une étude sur le même sujet, M^{me} AUBEL-LESURE (5, 6) a conclu qu'il existait dans le sérum frais un inhibiteur dont l'action se fait sentir à 37° et non à 4°.

En effet, après chauffage d'un sérum à 56° pendant 50 mn., le rapport N4 N37 est modifié; les symboles N4 et N37 représentent le nombre maximum d'hématies agglutinées respectivement à 4° et à 37°, par mm³ d'un mélange de sérum avec une suspension d'hématies.

L'auteur pense que cet effet inhibiteur est vraisemblablement dû à l'alexine ou à un de ses composants par recouvrement partiel de la surface des hématies à 37°.

Nous-mêmes avons pu vérifier ce fait : comme nous l'exposerons plus loin, nous utilisons dans le titrage de l'alexine, un système anti-homme. Les cobayes sont préparés avec des globules rouges humains du groupe O de préférence, mais il arrive qu'ils le soient avec des globules A ou B. Dans ce dernier cas, quand on titre le pouvoir hémolytique du sérum *frais* de cobaye anti-homme, vis-à-vis de globules du groupe A ou B, on n'observe pas d'agglutination. Mais, au moment de la sensibilisation des hématies de ce groupe (premier temps du titrage) par l'antisérum, qui est alors *chauffé*, on note une agglutination.

IV

ANTI-ALEXINES

C'est BORDET qui montra qu'en immunisant les animaux de laboratoire contre les sérums les plus divers, on obtenait des « anti-sérums » neutralisant les principes actifs qui interviennent dans les réactions de l'immunité humorale.

Dans le cas particulier qui nous intéresse, BORDET mit en évidence l'existence d'anti-alexine. C'est ainsi qu'en immunisant le lapin contre du sérum de cobaye préparé contre du sang de lapin, on obtient un sérum de lapin renfermant un anti-alexine et une anti-sensibilisatrice.

En effet, si on mélange cet anti-immunsérum avec du sérum hémolytique frais et des globules rouges de lapin, ces derniers restent intacts, tandis qu'ils se détruisent dans un mélange semblable mais contenant du sérum de lapin normal au lieu d'anti-immunsérum.

A côté de cette anti-sensibilisatrice, l'anti-sérum renferme une anti-alexine: les globules de lapin ne s'hémo lysent pas dans un mélange de sérum hémolytique frais et d'anti-sérum chauffé à 55°.

La présence d'anti-alexines a fait l'objet de controverses car on s'est demandé s'il ne s'agissait pas, dans ce phénomène, d'une absorption de l'alexine par le complexe antigène-anticorps formé.

Cependant on peut remarquer que la neutralisation de l'alexine était spécifique, alors que l'absorption ne l'était pas.

D'autre part, l'existence des antilaexines a été vérifiée par STRENG (123) en ayant recours au phénomène de la cong luti nation.

Des doutes subsistent encore, et nous trouvons dans un travail récent de MUTSAARS (91) une étude sur l'existence des antialexines.

Dans ces expériences, l'auteur a cherché à éliminer la cause d'erreur majeure: c'est-à-dire la fixation possible de l'alexine sur le complexe antigène-anticorps. Dans ces essais l'alexine est scindée en sa fraction globulinique et albuminique, par la méthode de LIEFMAN (dilution au 1/10^e dans l'eau distillée et action d'un courant de CO₂ gazeux).

C'est ainsi que des globules rouges sensibilisés ayant fixé C'1 et mis ensuite au contact de sérum de lapin-antisérum de cobaye, ne s'hémo lysent pas, quand on les soumet ensuite à l'action de C'2.

Au contraire, on constate dans une série d'essais que des hématies sensibilisées, ayant fixé C'1 et mises au contact d'un sérum hétérologue (sérum antityphique) s'hémo lysent parfaitement sous l'action de quantités adéquates de C'2.

Dans ces expériences, le sérum antialexique agit sur des globules sensibilisés ayant déjà fixé C'1, celui-ci ne peut donc se fixer sur un nouveau complexe antigène-anticorps, né du mélange du sérum anti-cobaye et de l'alexine du cobaye.

Dans un autre travail, l'auteur montre que l'action neutralisante du sérum antialexique se porte aussi sur C'2. D'autre part, l'auteur

a examiné le comportement de l'alexine complète sur les globules rouges sensibilisés ayant fixé C'1 et soumis à l'action du sérum anti-cobaye.

L'alexine complète se montre capable de les hémolyser alors que C'2 n'a pas d'action. Cette hémolyse est probablement due à l'action du C'1 et du C'2 de l'alexine totale surajoutée. Ces composants doivent se fixer en des points de la surface du globule rouge sensibilisé, restés libres lors de leur contact avec C'1.

Ce travail de MUTSAARS semble donc bien confirmer l'existence d'antialexine.

EFFETS ANTICOMPLÉMENTAIRES

Ce passage de notre travail est inspiré de la dernière publication de ECKER (40) sur le complément.

Depuis les travaux de DAVIS (23), on sait que des globulines hautement anticomplémentaires ont été séparées électrophorétiquement du sérum humain normal. De même, l'anticorps syphilitique, préparé par dissociation du précipité spécifique, se montre anticomplémentaire.

L'action anticomplémentaire est diminuée après chauffage à 56° pendant 30 minutes et inhibée par l'addition d'une quantité égale d'albumine ou de *béta* globulines d'un sérum normal.

Mais il est connu que certains sérums montrent un pouvoir anticomplémentaire, *après chauffage*.

OLHAGEN (96) dans une étude générale des effets anticomplémentaires, a remarqué que le chauffage produisait, dans les sérums fortement anticomplémentaires, une opalescence que l'on n'observe pas dans le cas de sérums faiblement anticomplémentaires ou normaux.

La dilution ou la filtration de tels sérums, avant inactivation, diminue leur pouvoir inhibiteur.

OLHAGEN a obtenu des diagrammes électrophorétiques pour 9 sérums très anticomplémentaires, qui révèlent dans 2 cas, l'existence d'un composé « X » qui migre entre les *béta* et γ globulines. Dans

sept cas, un composant anormal est observé, qu'on a appelé «Yx»: il présente une mobilité plus grande et une limite d'étalement plus faible qu'une γ globuline normale.

Dans 48 cas de sérums faiblement anticomplémentaires, aucun composant anormal n'a été observé. Cependant, on note un accroissement des γ globulines et une diminution des concentrations relatives d'albumines.

Une corrélation entre le pouvoir anticomplémentaire et la quantité de globulines n'a pas été établie. Aussi a-t-on pensé à un changement d'ordre qualitatif des γ globulines.

Par électrophorèse, comme par le fractionnement par les méthodes chimiques, il est possible d'isoler la globuline anticomplémentaire, relativement thermostable. La fraction séparée montre la même mobilité que les composants X et Yx. Il semble que ce soit une pseudoglobuline de poids moléculaire 170.000, donc supérieur à celui d'une γ globuline normale.

Yx montre 2 composants, dont un a une mobilité plus grande que la globuline non chauffée. Cette fraction serait responsable de l'opalescence observée.

OLHAGEN pense que l'effet anticomplémentaire est dû à une dénaturation des globulines, entraînant un changement dans la dispersion, qui amène l'absorption du complément.

Sur 404 cas de maladies du foie ou états apparentés, OLHAGEN a également remarqué que 18 % de ces sérums avaient des effets anticomplémentaires: 1/3 de ces sérums provenaient de cirrhoses ou d'hépatites chroniques. En s'appuyant sur ces faits, OLHAGEN recommande d'accorder une importance clinique à la constatation du pouvoir anticomplémentaire d'un sérum chauffé.

VII

ORIGINE DE L'ALEXINE

Le problème de l'origine de l'alexine ne semble pas encore résolu malgré les nombreuses recherches qu'il a suscitées.

La première hypothèse de travail a été l'origine leucocytaire, mais elle n'est pas avérée satisfaisante. On a, alors, incriminé certains organes (foie, rate) et, ces dernières années, le système réticulo-endothélial.

Pour METCHNIKOFF (84) les leucocytes élaborent l'alexine et la laissent échapper seulement lorsqu'ils souffrent ou sont détruits. On a pu constater, cependant, que des leucocytes soigneusement lavés fournissent des extraits qui n'ont pas de pouvoir complémentaire. De même, la raréfaction leucocytaire due aux rayons X ne s'accompagne pas d'une baisse de la teneur du sang en alexine.

Le problème de l'origine leucocytaire est lié à celui de savoir si l'alexine se trouve préformée ou bien si elle se forme dans le sérum au moment de la coagulation. En recueillant le sang dans un tube enduit de paraffine, à basse température, et en centrifugeant, on peut obtenir un plasma limpide, tel que le plasma circulant; or ce plasma se montre aussi alexique que le sérum.

De même, les plasmas oxalatés, le sang défibriné se montrent alexiques. Le sang d'oiseau est un autre exemple: il coagule lentement, si on évite toute souillure, il fournit un plasma exempt de cellules, qui est complémentaire.

Tous ces faits ne sont donc pas en faveur d'une origine leucocytaire.

En se basant sur des observations de pathologie clinique on a pensé à mettre en cause certains organes et tout d'abord, la rate. On sait que les animaux auxquels on a extirpé la rate conservent leur alexine. Nous avons eu personnellement à examiner deux sérums de sujets splenectomisés: l'un a montré une alexinémie normale; l'autre avait un taux d'alexine très abaissé, mais son cas était compliqué d'une cirrhose du foie, qui est peut-être incriminable.

Le rôle possible du foie a été examiné. On sait que l'extirpation de l'organe fait disparaître l'alexine. Cependant, comme le fait remarquer BORDET, on peut se demander si ce résultat n'est pas la conséquence indirecte de modifications importantes de la composition du sang, étant donné l'importance de l'organe qu'est le foie. En clinique, les différents auteurs ont remarqué que, chaque fois que la cellule hépatique est lésée, le taux de l'alexine est abaissé.

Nous mêmes l'avons constaté sur plusieurs cas dont nous reparlerons plus loin. Ces faits ne sont peut-être pas suffisants pour incriminer le foie comme producteur d'alexine, car dans les hépatites, l'équilibre protéique du sérum est bouleversé.

Depuis quelques années, de nombreuses recherches ont été orientées sur l'influence du système réticulo-endothélial dans les réactions immunitaires. On tend à attribuer à ce dernier la production d'anticorps. Quant au sujet qui nous intéresse, on a remarqué que des substances telles que le manganèse, le trypan bleu, l'encre de Chine, qui bloquent le système réticulo-endothélial sont aussi anticomplémentaires.

Mais cette action se vérifie *in vitro* et on peut se demander si ces substances ne sont pas anticomplémentaires par elles-mêmes.

En clinique, dans des maladies telles que la maladie de HOCKINGS et les parasitoses à protozoaires (paludisme en particulier) on admet aujourd'hui que le système réticulo-endothélial est atteint. Les chercheurs sont d'accord pour reconnaître une chute du pouvoir complémentaire dans ces cas.

Nous citerons à ce propos, un récent travail de LIGAS, d'une part, et d'ANDRINI et FALSETTI, d'autre part, guidés par ces observations.

LIGAS (74) observe chez des cobayes photosensibilisés à l'aide d'hématoporphyrine une élévation du pouvoir complémentaire. L'auteur pense que cette variation est due à la stimulation du système réticulo-endothélial provoquée par l'hématoporphyrine.

ANDRINI et FALSETTI (4) opèrent sur des individus normaux et paludéens et créent une activation histiocyttaire par injection intra-veineuse d'adrénaline. L'alexinémie des sujets en expérience se trouve augmentée et les auteurs concluent à l'intervention du système réticulo-endothélial dans la production de l'alexine.

Nous avons cité tous ces résultats qui nous permettent d'orienter nos connaissances sans toutefois conclure à la modalité de la production de ce facteur complexe qu'est le complément.

VIII

ROLE PHYSIOLOGIQUE

Les différents chercheurs qui ont entrepris l'étude de l'alexine n'ont pu définir quel rôle celle-ci jouait dans l'organisme, en dehors de sa participation aux phénomènes immunitaires de défense.

BORDET (15) lui-même, dans le traité de l'immunité, signale qu'on ne sait rien de précis. Il est certain que les êtres animés possèdent de l'alexine, à un taux pratiquement constant d'un individu à l'autre.

Nous verrons, plus loin, quelles peuvent être les variations de l'alexinémie au cours de certains états pathologiques.

Les auteurs se sont demandés si la valeur du titre alexique pouvait avoir un intérêt pronostique ou diagnostique. Depuis longtemps, on sait qu'il y a une chute de l'alexinémie au moment de la mort. A ce propos, nous reprendrons l'affirmation de HECHT (54). « Tout être animal vivant, l'homme y compris, possède du complément dans le courant sanguin. La perte permanente de complément signifie la mort. ».

Toutefois, nos connaissances se sont enrichies dans ce domaine grâce à une étude de la physiologie du leucocyte de cobaye par DELAUNAY et PAGES, poursuivie par ROBINEAUX sur le leucocyte humain.

Nous exposerons ces travaux qui mettent en évidence le rôle du complément dans la physiologie du leucocyte.

Tout d'abord, DELAUNAY et PAGES (24, 25) ont montré qu'en absence de complément, tout chimiotactisme était impossible.

Les déplacements des leucocytes (exsudat péritonéal de cobaye) sont observés *in vitro*, par la technique de Comandon : des grains d'amidon isolés sont étalés sur lame et fixés par dessiccation. Lorsqu'on dépose une goutte d'exsudat péritonéal, on observe à 37° une migration des cellules vers les grains d'amidon ; les polynucléaires s'accolent à la périphérie en formant des croissants faciles à voir.

Or, ce tactisme ne se produit plus si les leucocytes ne se trouvent plus dans un milieu sérique frais : ainsi, dans les plasmas citratés, les sérums vieillis ou chauffés ou bien décomplémentés spécifiquement.

Tous ces faits sont en faveur de la nature complémentaire de ce constituant indispensable du sérum frais.

Comme nous l'avons indiqué en parlant du rôle du complément dans la phagocytose, DELAUNAY et PAGES ont aussi montré que, dans la phagocytose de l'amidon de riz, le complément a un effet favorisant, qui se porte sur les leucocytes eux-mêmes.

Dans une autre série d'expériences, ces mêmes auteurs ont étudié le métabolisme respiratoire des leucocytes, et ils ont trouvé que l'intensité du métabolisme était plus grande quand le liquide de RINGER était additionné de *sérum frais, non dilué*.

Des expériences semblables ont été entreprises par ROBINEAUX (111) en opérant sur les leucocytes humains. Les résultats concordent avec les précédents : le tactisme leucocytaire est diminué en présence de sérum dilué, de sérum chauffé à 56° pendant une demi-heure ou de sérum vieilli.

Tous ces travaux sont intéressants par le fait que, pour la première fois, on peut parler d'une propriété physiologique du complément.

IX

COMPLEMENT ET COAGULATION

Les deux phénomènes complexes de l'activité complémentaire et de la coagulation du sang ont, depuis longtemps, attiré l'attention des chercheurs.

Des faits expérimentaux suggèrent l'hypothèse séduisante de l'identité ou tout au moins d'un rapport étroit entre alexine et prothrombine.

C'est FUCHS (43) le premier qui émit cette idée et la confirma en se basant sur le fait que, alexine (particulièrement « midstuck ») et

prothrombine font partie du groupe des globulines de sérum, et sont inactivées par chauffage à 56° .

Les deux facteurs sont fixés par les adsorbants, mais comme le remarque BORDET, si le phosphate tricalcique absorbe faiblement l'alexine, il s'empare fortement de la thrombine, et celle-ci n'est pas fixée par les antigènes sensibilisés.

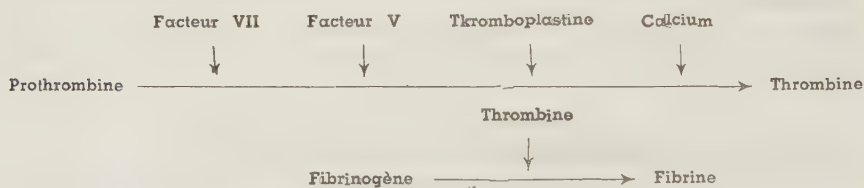
De nombreux travaux ont été entrepris dans le but d'éclaircir ce problème. On peut distinguer deux idées directrices : celle qui vise à étudier le rôle des ions Ca^{++} et celle qui se base sur l'action des anticoagulants, en particulier du dicoumarol.

a) Action parallèle des ions Ca^{++} .

On sait que, dans le processus complexe de la coagulation, interviennent plusieurs facteurs : prothrombine, thromboplastine, un activateur euglobulinique (facteur V), fibrinogène, ainsi qu'un facteur d'origine plaquettaire et les ions Ca^{++} .

Des travaux récents (KOLLER et ses collaborateurs (65), OWREN (97)) ont montré que la prothrombine elle-même était constituée de deux facteurs, le précurseur de la thrombine, c'est-à-dire, la véritable prothrombine et un facteur qui accélère la conversion de la prothrombine, nommé facteur VII.

Nous empruntons à KOLLE ce schéma de la coagulation :



Le citrate de soude, de même que le fluorure et l'oxalate se comportent comme des anticoagulants par blocage du calcium sous forme de sel peu dissocié ou insoluble.

D'autre part, le citrate de soude agit aussi comme inhibiteur de l'hémolyse. Nous avons vu précédemment que certains auteurs attribuent cette inhibition à la formation de complexes.

DIACONO (28) a pu montrer que l'inhibition était due à un blocage des ions Ca^{++} . En effet, si dans un système hémolytique (sérum

de cobaye anti-mouton et hématies de mouton) on ajoute du citrate de soude, pour une certaine dose, l'hémolyse ne se produit pas. On obtient à nouveau la lyse, si on recalcifie, et la dose compensatrice de chlorure de calcium correspond exactement à la dose inhibitrice de citrate de soude (1 molécule pour 3).

Récemment, ce travail a été repris dans le but d'éclaircir les rapports entre hémolyse et coagulation par DIACONO H., GUILLOT M. et FIEHRER A. (29). On bloque le Ca^{++} sans l'éliminer par une modification de l'équilibre ionique en utilisant un « plasma hypertonique ».

Ce plasma incoagulable est obtenu en mélangeant le sang avec la solution de THOMAS J. A. : chlorure de sodium 85 g., phosphate monopotassique 1 g., phosphate disodique 9 g., sulfate de magnésium 1,5 g., eau q. s. ‰.

On restitue les propriétés coagulantes en ajoutant une solution de gluconate de calcium à 0,75 g. ‰.

De la même manière, l'hémolyse est inhibée dans un plasma hypertonique et restituée par addition de gluconate de calcium.

Les auteurs n'ont pas conclu sur ces données et ont poursuivi d'autres essais sur cette idée que nous examinerons plus loin : un sérum privé de prothrombine est-il alexique ?

Il nous reste à citer l'expérience intéressante de RANQUE (104) sur le plasma citraté.

L'auteur emploie du plasma citraté humain comme source d'alexine.

En effet, lorsque ce plasma est introduit dans un système hémolytique, la concentration en citrate de soude est diminuée et il se forme un gel qui est une coagulation plasmatique, puis dans les tubes où la quantité d'alexine est suffisante, l'hémolyse se produit.

Ce qui montre que l'activité complémentaire n'est pas gênée par une coagulation préliminaire.

D'autre part, dans les tests de fixation, RANQUE a vérifié que le phénomène de fixation n'empêche pas une coagulation.

Ces faits ne permettent pas de conclure à une parenté entre les facteurs alexine et prothrombine.

De toutes ces expériences, il reste cependant un parallélisme remarquable entre les effets des ions Ca^{++} sur l'activité complémentaire et sur la coagulation.

Il est intéressant de signaler le travail de MALTANER sur l'effet activant de l'ion Mg^{++} parallèlement dans les deux phénomènes.

Mais l'expérience concluante est certainement celle qui étudie le comportement alexique d'un sérum privé de prothrombine.

b) *Anticoagulants.*

On connaît depuis quelques années des anticoagulants et parmi ceux-ci le plus intéressant semble le *dicoumarol* qui inhibe la formation de la vitamine K, et partant, la prothrombine dans le foie. Le sérum d'animaux soumis à un traitement au dicoumarol, devient un matériel d'étude intéressant. Ce travail a été réalisé par plusieurs chercheurs.

MILLA et CASTEGNANO (87, 88) observent chez des cobayes, auxquels on administre de faibles doses de dicoumarol, que le temps de prothrombine est nettement augmenté tandis que le pouvoir complémentaire ne varie pas de façon appréciable.

Les mêmes essais ont été effectués par BOULANGER P. et RICE C.C. (108) qui concluent aux mêmes résultats. On trouve en même temps dans ce travail, une étude critique des tests de coagulation : méthode de HOWELL, de QUICK et méthode en deux temps. Le dicoumarol agirait sur un facteur accélérateur de la conversion de la prothrombine en thrombine, « l'accelerator-globuline » ou facteur de OWREN.

Par contre, une série d'expériences sur le même thème de LIVOTI et MUTOLO (75) aboutit à des conclusions différentes.

Le plasma de cobayes qui ont subi le traitement au dicoumarol, ne se montre plus complémentaire. Les auteurs ne se basent pas sur ces résultats pour affirmer une analogie entre prothrombine et alexine, mais ils admettent que la déprothrombination est un facteur de déséquilibre colloïdal du plasma, ce dernier amenant une diminution de l'activité complémentaire.

MANN et HURN (78) montrent d'une façon indirecte l'intervention du complément dans la coagulation : un plasma inactivé (par conservation, par action du zymosan ou de l'ammoniaque) est privé

aussi de sa capacité à former la thrombine. La conversion de la prothrombine en thrombine est donc bloquée, alors qu'il reste un excès de prothrombine capable de réagir.

Nous signalerons enfin les essais de DIACONO H., GUILLOT M. et FIEHRER A. (29) qui obtiennent un sérum privé de prothrombine en faisant coaguler le sang en présence d'un excès de thromboplastine : en effet, si la coagulation a lieu en présence d'un très grand excès de thromboplastine, la thrombinoformation s'effectue presque instantanément aux dépens de toute la prothrombine. L'excès de thrombine est absorbé par le caillot et, dans le sérum, on ne retrouve que de la thromboplastine soluble active, sans trace de prothrombine.

Les auteurs opérant sur du sang de cobaye anti-mouton ont pu constater que le taux alexique du « sérum thromboplastiné » ne variait pas.

Le problème des relations entre hémolyse et coagulation reste complexe. Les résultats des différents chercheurs ne concordent pas. Néanmoins, sans identifier prothrombine avec alexine, il est remarquable de constater des caractères de similitude entre les deux phénomènes de l'activité complémentaire et de la coagulation.

Personnellement, nous avons apporté notre contribution à ce problème en étudiant l'influence de deux anticoagulants, de mode d'action différent, l'héparine et le tromexane, sur l'alexinémie.

DEUXIEME PARTIE

PRINCIPALES METHODES DE TITRAGE DE L'ALEXINE

Depuis longtemps, les chercheurs ont mis sur pied des techniques de dosage de l'alexine, pour pouvoir suivre les variations de ce constituant du sérum, soit dans des études *in vitro*, sur le constituant lui-même, soit *in vivo*, dans les états physiologiques et pathologiques.

On trouve, ainsi, dans la littérature, de très nombreuses méthodes de titrage du complément, et nous signalerons au passage celles qui nous ont paru intéressantes.

Toutes ces déterminations quantitatives du complément sont basées sur l'effet lytique de ce constituant. La complexité du phénomène et des rapports entre les éléments de la réaction rendent la tâche compliquée.

Les chercheurs se sont ingéniés à éliminer les causes d'erreur, à standardiser les réactifs de façon à obtenir les résultats les plus sensibles et les plus reproductibles.

Pendant longtemps, on a choisi comme terme de la réaction, l'hémolyse *complète* d'une dose fixe de globules rouges et la plus petite dose de sérum qui produisait cette hémolyse était prise comme unité.

Des études, dont l'application est récente, sur la cinétique de l'hémolyse, ont montré que le point où l'hémolyse est totale n'était pas un critère exact, tandis que le point où il y a 50 % d'hémolyse est en rapport direct avec l'activité du complément.

Nous nous proposons de passer en revue les principaux types de réaction mis au point pour la détermination de l'alexinémie.

A cet effet, nous envisagerons :

1° une étude analytique des éléments qui constituent tout système hémolytique;

2° la description de quelques méthodes, dont certaines ont été soumises à notre expérience :

a) méthodes basées sur un système anti-homme: VARGUES, PECK et THOMAS.

b) méthodes basées sur un système anti-mouton: MEERSSEMAN, RANQUE.

3° l'étude des bases de la détermination de l'unité 50 %.

4° la description de deux méthodes dont le principe ne réside pas dans l'appréciation d'une hémolyse.

I

LES ELEMENTS

DU SYSTEME HEMOLYTIQUE

Quel que soit le système de base choisi, la réaction hémolytique s'effectue par le jeu de trois éléments: alexine, globules rouges et hémolysines spécifiques, dans des conditions bien définies.

Nous allons examiner successivement chacun de ces réactifs.

1° SÉRUM HUMAIN A EXAMINER

Le sang est recueilli par ponction veineuse, le sujet étant à jeun.

On laisse coaguler et on centrifuge pour recueillir le sérum.

L'examen doit être fait dans les 4 à 5 heures qui suivent le prélèvement mais on peut conserver le sérum au réfrigérateur 24 heures.

On a remarqué que, si le sérum était conservé sur caillot, son alexine était mieux préservée. HECHT (54) pense que cette action protectrice est due à la présence de fibrinogène.

Pratiquement, le dosage de l'alexine se fait toujours sur le sérum. L'opinion courante est que le plasma de sang recueilli sur oxalate, fluorure ou citrate de sodium, n'est pas alexique, à cause du blocage des ions calcium. Cependant nous avons pu constater que, en recueillant du sang de cobaye sur oxalate (2 mg. d'oxalate de sodium par cm³) le plasma a le même taux alexique que le sérum d'un échantillon du même sang coagulé normalement.

RANQUE (104), comme nous l'avons déjà signalé, utilise du plasma de sang citraté, comme source d'alexine dans les réactions de fixation.

2° SUSPENSION GLOBULAIRE

Origine des globules rouges.

Les globules rouges utilisés peuvent être des globules rouges de mouton ou des globules rouges humains.

Les *globules rouges de mouton* sont obtenus à partir de sang défibriné, recueilli aseptiquement. Le sang est centrifugé, on décante le liquide surnageant et on remet le culot globulaire en suspension dans de l'eau physiologique. On centrifuge et on décante à nouveau le liquide surnageant. On recommence la même opération trois à quatre fois.

Les *globules rouges humains* peuvent être obtenus en dilacérant un caillot, ou bien à partir de sang oxalaté.

La purée globulaire est lavée trois fois avec de l'eau physiologique, dans les mêmes conditions que le sang de mouton.

Dans le cas de globules humains, il est préférable d'utiliser des globules du groupe O : ceci pour éviter une agglutination au moment de la sensibilisation, quand l'animal qui fournit l'hémolysine a été préparé avec des hématies du groupe A ou B.

Concentration de la suspension globulaire.

L'activité hémolytique d'un sérum va dépendre, toutes conditions de concentration définies et en présence d'un taux optima d'hémolysines, de la quantité d'hématies mises en jeu. Il est donc absolument essentiel de fixer la concentration de la suspension et d'avoir un moyen de vérifier qu'elle est semblable à elle-même.

Aussi les auteurs proposent-ils différents procédés pour standardiser la suspension globulaire. On trouve dans la littérature des suspensions définies comme suit :

Suspension isoglobulaire.

On ajuste la suspension de façon qu'une prise d'essai lue à l'hématimètre de Malassez donne toujours le même chiffre de cellules.

Ainsi, MAYER, EATON et HEIDELBERGER (79) utilisent une suspension à 5 % qu'ils ajustent en vérifiant qu'elle renferme 1 million de globules par mm³.

Isolipolidique.

Cette standardisation est proposée par SCARTOZZI (116) qui se base sur le fait que l'hémolyse par les saponines se rapproche plus de l'hémolyse biologique que l'hémolyse par l'eau distillée, en ce sens qu'elle agit directement sur le stroma lipopéidique du globule.

La suspension d'hématies que SCARTOZZI utilise dans sa méthode de dosage doit être telle que 0,5 cm³ de celle-ci soit lysé par 0,7 cm³ d'une solution fraîchement préparée de saponine à 3/20.000. L'essai doit être effectué à 37° pendant 5 minutes puis refroidi 5 minutes dans un bain froid pour éviter des hémolyses partielles qui gênent la lecture.

Isopondérale.

Celle-ci est proposée par le même auteur; on pipette des globules soigneusement centrifugés et on en pèse un gramme pour 19 g. d'eau physiologique. Cette opération est d'un usage peu pratique.

Isochromatique.

C'est la méthode qui est actuellement la plus employée, bien que SCARTOZZI l'ait vivement critiquée, et qui semble la meilleure puisqu'elle tient compte de la valeur globulaire des hématies.

Elle consiste à lyser une quantité déterminée de suspension et à doser colorimétriquement la solution d'hémoglobine obtenue.

Dans cette solution, l'hémoglobine se trouve sous forme d'oxyhémoglobine mais il se produit aussi une transformation en méthémoglobine.

Les auteurs font généralement leur lecture à une longueur d'onde de 5.500 Å, qui représente un maximum d'absorption pour l'oxyhémoglobine.

Malgré la présence de méthémoglobine entraîne une légère erreur par défaut, car elle est moins absorbée que l'oxyhémoglobine à cette longueur d'onde. Il faudrait pouvoir opérer à une longueur d'onde de 5.200 Å, longueur d'onde à laquelle oxy et méthémoglobine présentent la même absorption. Cela n'est possible que si l'on dispose d'un spectrophotomètre.

En pratique, les auteurs opèrent à une longueur d'onde de 5.500 Å. Comme l'indiquent KABAT et MAYER (62) l'erreur due à la méthémoglobine peut être considérée comme négligeable du fait que le degré de lyse est calculé par le rapport de deux densités optiques,

Ainsi, RANQUE prépare une première suspension à 4 % de purée globulaire. Il lyse 0,75 cm³ avec 1,25 cm³ d'eau distillée et obtient une solution d'indice optique 0,00155 au photomètre de Vernes. Ceci correspond à un pourcentage d'hémoglobine de 93,9 %, nombre relatif calculé par rapport au taux normal d'hémoglobine du sang humain par la méthode de G. GAUDE.

MAYER, EATON et HEIDELBERGER qui, nous l'avons vu précédemment, procèdent à une numération des cellules, proposent une lecture colorimétrique, plus commode. 1 cm³ de la suspension d'hématies de mouton, voisine de 5 % est lysée par 14 cm³ d'eau distillée et doit donner au spectrophotomètre de Coleman une densité optique de $D_{5.500 \text{ Å}} = 0,56$.

KENT, BUKANTZ et REIN (63) utilisent une suspension standardisée de la même manière.

ROULIER (115) en lysant 0,50 cm³ de la suspension dans 5,5 cm³ d'eau distillée doit obtenir une densité 50 au photolorimètre de BONET-MAURY.

Nous donnerons plus loin le détail de notre façon d'opérer, en notant au passage, que nous effectuons la lyse des hématies avec une solution alcaline pour avoir une solution d'oxyhémoglobine absolument limpide et stable.

Conservation des hématies.

Il est indispensable de disposer, en permanence au laboratoire, de globules rouges. Or même au réfrigérateur, les hématies se conservent mal, celles de mouton étant plus fragiles que les hématies humaines. On trouve dans la littérature plusieurs formules de liquides conservateurs : ROULIER propose de recueillir le sang de mouton sur citrate, la défibrination par les billes de verre altérant les globules.

Nous avons expérimenté le milieu hypertonique de ALSEVER's :

glucose	2,05 g.
citrate de sodium.....	0,8 g.
chlorure de sodium.....	0,42 g.
eau q. s. pour.....	100 cm ³

Ajuster à pH 6,1 avec de l'acide citrique.

Le sang est mélangé à parties égales avec cette solution ; il peut être conservé et utilisé plusieurs semaines.

Les auteurs anglo-saxons préconisent un autre milieu tampon au véronal - chlorure de sodium de pH 7,3 à 7,4 :

chlorure de sodium	85 g.
5,5 diéthylbarbiturique acide.....	5,75 g.
5,5 diéthylbarbiturate de sodium..	3,75 g.
eau q. s. pour.....	2000 cm ³

Ils utilisent ce même milieu pour laver les hématies. et, comme véhicule de tous les éléments de la réaction.

Récemment, MESSERLIN et LÉVÈQUE (84) ont expérimenté l'action d'un dérivé de la phénothiazine, le 3277 RP. Ce dérivé, ajouté à la concentration de 1/15.000 dans le liquide de WURMSER permet de conserver les hématies intactes pendant plusieurs mois.

3° SÉRUM HÉMOLYTIQUE

Origine.

Les hémolysines spécifiques sont obtenues artificiellement par l'immunisation d'animaux. On prépare ainsi des lapins anti-mouton, des cobayes anti-mouton ou anti-homme, des chevaux anti-homme.

Le *lapin* est l'animal classique. Il est préparé par des injections intrapéritonéales ou intraveineuses de globules rouges de mouton.

Le sang de mouton est recueilli et lavé, comme pour la préparation de la « suspension globulaire », mais dans des conditions aseptiques rigoureuses. Les lavages doivent être soigneusement faits de façon à éliminer complètement le plasma.

Pour éviter les phénomènes de choc, « l'*Army Medical School* » (26) propose d'employer comme antigène, les stromas globulaires préparés par action d'ambocepteur et de complément sur les hématies de mouton.

Le titre hémolytique est maintenu par des injections hebdomadaires de purée globulaire.

Le lapin fournit généralement de bons sérums hémolytiques. Par contre, il réagit mal aux injections d'hématies humaines, et ne peut être utilement employé pour la préparation de sérum anti-globules rouges humains.

Le *cobaye* peut servir aussi bien à préparer des animaux anti-mouton que des animaux anti-homme.

Les globules rouges de mouton ou d'homme sont obtenus comme il est dit pour la préparation de la suspension globulaire.

Les injections sont faites par voie intrapéritonéale. Les animaux supportent bien cette préparation.

Le cheval donne un bon sérum hémolytique anti-homme qui est commercialisé par le laboratoire du D^r MUSSO à Saintes. Ce sérum est utilisé en particulier par VARGUES dans sa méthode de titrage du complément.

Titre du sérum hémolytique.

Le sang, recueilli par ponction veineuse ou cardiaque est mis à coaguler. On recueille le sérum et on l'inactive en le chauffant à 56° pendant une demi-heure.

Ce sérum hémolytique est alors soumis à un titrage. Le titrage du sérum hémolytique est absolument essentiel pour la réaction d'hémolyse. Il permet de déterminer une unité hémolytique qui représente généralement la plus faible quantité de sérum hémolytique capable de provoquer l'hémolyse d'une quantité fixe de globules rouges et de complément.

Cette unité est relative au système hémolytique et dépend de la quantité de complément présente. Il y a, en effet, une interaction entre hémolysine et complément, que l'on exprime par la loi de suppléance.

Depuis longtemps, RONCHESE (112) en a donné cette expression numérique :

complément	3	2	1	1/2	1/3	1/5
ambocepteur	1/3	1/2	1	2	3	8

En effet, on a constaté que, pour provoquer la lyse d'une quantité fixe de globules rouges, il y a une quantité minima d'hémolysines au-dessous de laquelle l'hémolyse ne se produit pas, quelle que soit la dose de complément présente.

C'est la *dose minima d'hémolysines* qu'obtiennent les auteurs qui effectuent le titrage du sérum hémolytique en présence d'un excès de complément.

D'autre part, il y a une quantité minima de complément au-dessous de laquelle l'hémolyse ne peut se produire, quelle que soit la dose de sérum hémolytique.

C'est ainsi qu'en titrant le complément en présence d'un excès

d'hémolysines, on obtient la *dose minima active de complément*.

Dans les méthodes modernes de la réaction de fixation, c'est cette dose que l'on cherche.

TABLEAU 4
Titration de complément et d'hémolysine.

Hémolysine cm ³ × 10 ⁻⁵	Hémolysine N	Complément cm ³				
		10 × 10 ⁻³ C'N=0,5 µg	6,25 × 10 ⁻³ C'N=0,3 µg	4 × 10 ⁻³ C'N=0,2 µg	2,5 × 10 ⁻³ C'N=0,13 µg	1,67 × 10 ⁻³ C'N=0,08 µg
6	microg. 0,03	c	c	c	c	+++ ±
4	0,02	c	c	c	c	++
3	0,015	c	c	c	++++ ±	++
2	0,01	c	c	++++ ±	++	+
1,5	0,008	c	c	+++	+	±
1	0,005	+++	++	+	0	0
0,75		++	+	±	0	0
0,5		+	+	0	0	
0		0	0			

Symboles: 0 = pas d'hémolyse, ± = trace, + = faible, ++ = moyenne, +++ = forte, +++ ± = presque complète, c = complète

Ces données sont illustrées par les résultats des dosages de complément et d'hémolysine, exprimés en azote, rassemblés dans le tableau 4, emprunté à KABAT et MAYER (62).

En dehors de cette relation entre hémolysine et complément, une notion nouvelle s'ajoute, depuis les travaux de LAPORTE et HARDRE DE LOOZE (70), celle de la *qualité* des hémolysines.

C'est ainsi que, d'après ces auteurs, l'unité de complément, obtenue par l'emploi à dose élevée d'un sérum hémolytique donné, diffère de celle obtenue en employant un autre sérum également pris en excès.

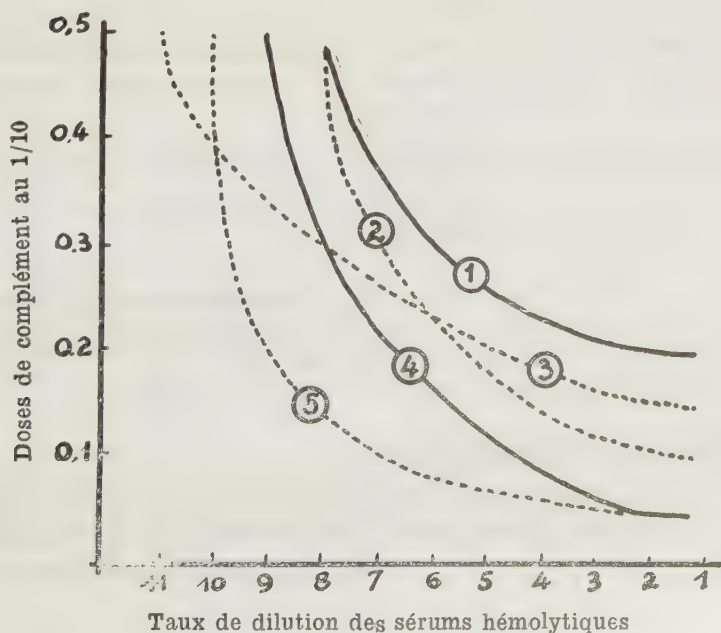
Seuls certains sérums permettent de limiter la dose minima de complément à une quantité très réduite

Le tracé des courbes de la loi de suppléance obtenues avec un certain nombre de sérums hémolytiques permet de se rendre compte de ces faits.

Nous reproduisons ci-dessous la figure donnée par les auteurs.

La dose minima active est représentée par l'ordonnée du point extrême de la courbe situé à la partie inférieure et droite. Dans le cas présent, seuls les sérums 4 et 5 donnent la même dose minima.

FIGURE 2



On trouve une application de ces données dans le travail de ROULIER (115) sur une « réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 % ».

Cet auteur cherche la dose minima active de complément (en unités 50 %) en présence d'un fort excès de sérum hémolytique. Puis il détermine la dose optima d'hémolysines en présence de l'unité 50 % ainsi calculée.

Cette dose optima est la dose la plus faible de sérum hémolytique qui permette d'obtenir encore 50 % d'hémolyse en présence de cette quantité fixe et connue de complément.

Dans les réactions de fixation, pour le titrage du complément, les auteurs utilisent 2, 3, 4 ou plus d'unités hémolytiques, de façon à déterminer la dose minima active de complément par rapport à cet excès d'hémolysines. D'après DEMANCHE (26), cette préoccupation d'employer le moins de complément possible pour augmenter la sensibilité de la réaction de fixation est basée sur deux raisons : parce que le sérum de cobaye introduit une albumine étrangère qui tend à neutraliser la réagine syphilitique, et que le complément aura d'autant plus de chance d'être fixé par le complexe antigène-anticorps spécifique qu'il interviendra en plus petite quantité.

Sensibilisation des hématies.

Les travailleurs ont pu constater qu'il était préférable de mélanger, au préalable, le sérum hémolytique et la suspension globulaire, plutôt que de les distribuer séparément.

C'est ce qu'on appelle sensibiliser les hématies. L'opération s'effectue généralement à la température du laboratoire, pendant un temps variable suivant les méthodes.

Le rapport des volumes de suspension globulaire et d'immunsérum varie selon les auteurs. Il semble préférable d'ajouter la dilu- modifier le taux de la suspension globulaire.

tion de sérum hémolytique, sous un faible volume, pour éviter de

Hémolysines naturelles.

La présence d'hémolysines naturelles anti-mouton dans le sérum humain a été mise à profit dans une modification de la réaction de Wassermann par HECHT. Cependant, ce pouvoir hémolytique natu-

rel constitue un gros inconvénient pour le titrage du complément dans le système classique anti-mouton.

Ces hémolysines n'existent d'ailleurs pas de façon constante et leur taux peut varier considérablement.

Aussi cherche-t-on à les éliminer en les faisant absorber par des hématies de mouton, à la glacière.

Dans la méthode de MEERSSEMAN (83), on n'élimine pas les hémolysines naturelles mais on en tient compte en opérant toujours en présence d'une quantité constante de sensibilisatrice anti-mouton : dans un premier temps, on titre la sensibilisatrice naturelle anti-mouton du sérum à examiner. Puis on lui ajoute une quantité de sérum hémolytique anti-mouton telle que la teneur totale en sensibilisatrice atteigne une valeur déterminée, constante pour tous les examens.

Un autre moyen d'éviter l'erreur due aux hémolysines naturelles est d'employer un système homologue, c'est-à-dire globules rouges humains et sérum anti-globules rouges humains.

On a beaucoup critiqué cet usage en prétendant que les hématies humaines n'étaient pas de bons antigènes et qu'il était difficile d'obtenir des sérums hémolytiques riches.

Après d'autres auteurs (VARGUES, PECK et THOMAS) cependant, nous avons basé notre méthode de titrage sur un système anti-homme que nous exposons plus loin.

II

a) METHODES BASEES SUR UN SYSTEME ANTI-HOMME

MÉTHODE DE VARGUES

Cette méthode constitue un exemple de l'utilisation du système hémolytique anti-homme.

Le sérum hémolytique, du sérum de cheval immunisé contre des globules rouges humains, est fourni commercialement par le Docteur MUSSO à Saintes.

Son titre est stable ; on peut le vérifier par un titrage classique.

Il présente un inconvénient, celui de renfermer des agglutinines auquel on obvie en ne faisant pas de sensibilisation préalable des hématies.

L'auteur attire l'attention sur l'obtention d'une *suspension globulaire standardisée*; on retient la dilution pour laquelle il y a hémolyse complète de 0,1 cm³ de cette suspension avec 0,1 cm³ de sérum hémolytique et 0,2 cm³ d'un mélange de sérums humains frais.

Comme la dénomme l'auteur, c'est une suspension isolysable, au lieu de isoglobulaire ou isochromatique. Sa concentration est à peu près de 5 %.

Le protocole opératoire est schématisé dans le tableau suivant :

TABLEAU 5

	cm ³									
eau physiologique	0,75	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	
sérum humain à titrer.....	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	
sérum anti-humain dilué au 1/2	0,10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
suspension d'hématies O.....	0,10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
1/2 heure à 37°										

Nous avons examiné, à l'aide de ce protocole opératoire, deux sérums humains supposés normaux et nous avons obtenu dans les deux cas :

Hémolyse totale dans le tube renfermant 0,20 cm³ de sérum humain, dose normale suivant les indications de l'auteur.

Les mêmes sérums sont titrés selon notre technique personnelle et nous obtenons un taux normal, soit 0,04 cm³ de sérum humain.

Cette méthode a permis à VARGUES de poursuivre une étude très intéressante, sur les variations de l'alexinémie au cours du paludisme.

MÉTHODE DE PECK J. et THOMAS L. (99)

A la base de cette méthode, nous trouvons aussi un système anti-homme. Mais sa particularité vient de ce que les auteurs sensibilisent les hématies humaines à l'aide d'un ambocepteur artificiel : l'acide tannique.

On connaît, depuis longtemps, des ambocepteurs artificiels : c'est ainsi que LANDSTEINER (69) avait montré que les globules rouges sont agglutinés par de faibles quantités d'acide silicique, puis hémolysés par le complément.

REINER et FISCHER (105) avaient constaté le même effet avec l'acide tannique. GORDON et THOMPSON (50) ont remarqué que l'acide tannique augmentait aussi la phagocytose des staphylocoques.

Cette activité sensibilisante de l'acide tannique a été mise à profit récemment par PECK et THOMAS dans une méthode simplifiée de titrage du complément.

TABLEAU 6

	cm3					
Sérum humain à titrer.....	0,07	0,08	0,05	0,04	0,03	0,02
Eau physiologique à 7 ‰.....	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18
Globules rouges sensibilisés.....	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Eau physiologique à 7‰.....	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
1/2 heure à 37°						

La plus petite quantité de complément produisant l'hémolyse complète est prise comme point limite, et, représente une unité d'activité du sérum.

Remarques sur les réactifs :

Le véhicule est une solution de chlorure de sodium à 7 ‰. Cette concentration est optima : plus élevée, elle ne permet pas la sensibilisation des globules rouges.

L'ambocepteur est constitué par une solution d'acide tannique à 0,06 g. % préparée le jour même.

La suspension globulaire est à 1 ‰. Les hématies doivent être parfaitement bien lavées, car la moindre trace de sérum ou de protéines empêche la sensibilisation.

Cette sensibilisation est le résultat d'une absorption : en effet, des globules rouges séparés par centrifugation de la solution d'acide tannique, après un certain temps d'exposition, sont encore susceptibles d'être lysés.

Mais le mélange acide tannique-globules doit être fait à part, et, ajouté ensuite au sérum ; en effet, le tanin a une affinité plus grande pour le sérum, et, si on procède inversement, l'hémolyse ne se produit plus.

La simplicité de la méthode et la facilité de se procurer les réactifs nous ont conduits à expérimenter cette technique.

En nous plaçant dans les conditions optima indiquées par les auteurs, nous avons ainsi examiné 45 sérums normaux.

Pour les douze premiers sérums, l'hémolyse totale s'est produite par une dose de 0,05 à 0,06 cm³ de sérum pur.

Par la suite, dans la majorité des cas, — et nous sommes sûrs que les sérums n'étaient pas analéxiques —, nous n'avons observé aucune hémolyse. Ces échecs nous ont amené à effectuer quelques essais :

— en opérant comparativement avec des globules rouges provenant de la dilacération d'un caillot, ou bien de sang oxalaté.

— en augmentant le nombre des lavages des hématies pour éliminer toute substance protidique.

— en neutralisant exactement l'eau distillée qui était légèrement acide.

La discordance des résultats obtenus ne nous a pas permis de tirer une conclusion. Nous avons abandonné cette technique dont nous pensions, à l'origine, nous servir pour titrer des compléments comparativement avec le protocole que nous avons mis au point.

b) METHODES DE TITRAGE DU COMPLEMENT A L'AIDE DE SYSTEME ANTI-MOUTON

Parmi les nombreuses méthodes de titrage utilisant un système hémolytique anti-mouton, nous citerons celles mises au point par MEERSSEMAN en 1936 et par RANQUE en 1942.

MÉTHODE DE MEERSSEMAN (83)

Comme nous l'avons déjà signalé, l'originalité de cette méthode consiste à opérer en présence d'une quantité constante de sensibilisatrice anti-mouton, de façon à supprimer l'action des hémolysines naturelles anti-mouton du sérum humain.

La détermination du pouvoir alexique comporte dans un premier temps, la détermination de l'index hémolytique.

On fait agir le sérum à titrer inactivé, sur des doses croissantes d'hématies de mouton non sensibilisées, en présence d'alexine de cobaye titrée.

Le protocole opératoire est schématisé par le tableau suivant :

TABLEAU 7
Détermination de l'index hémolytique

	cm3									
Sérum à titrer (inactivé)....	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Alexine de cobaye à 1 %..	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Globules rouges de mouton										
à 5 %	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Eau physiologique	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
30 minutes à l'étuve à 37°, puis 30 minutes à la température du laboratoire										
Résultats (exemple)	H	H	H	H	H	Hp	o	o	o	o

A la valeur de cet index hémolytique, on ajoute une quantité de sérum hémolytique telle que 0,1 cm3 de ce sérum renferme au total 30 unités hémolytiques.

Le titre alexique est alors déterminé en opérant comme il est indiqué dans le tableau suivant.

Le sérum hémolytique est constitué par du sérum de lapin anti-mouton, préalablement titré.

La suspension globulaire est standardisée de façon que la dilution de 0,1 cm³ dans 9,9 cm³ d'eau physiologique ait une densité optique de 80 à 90 degrés photométriques, au photomètre de Vernes.

TABLEAU 8
Titrage du pouvoir alexique

	cm ³									
Sérum à titrer	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sérum hémolytique dilué à son titre	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Globules de mouton à 5 %	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Eau physiologique	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7
30 minutes à l'étuve à 37°, puis 30 minutes à la température du laboratoire										
Résultats (exemple)	H	H	H	H	H	Hp	Hp	o	o	o

Le pouvoir alexique est donné par la quantité maxima d'hématies totalement hémolysées; par exemple, si l'hémolyse totale se produit pour une dose maxima de 0,5 cm³ de suspension globulaire, le pouvoir alexique est égal à 5.

Cette valeur représente une normale d'après les observations de l'auteur.

MÉTHODE DE RANQUE (104)

Le protocole opératoire est illustré par le tableau 9 (p. suivante).

Le pouvoir alexique est inversement proportionnel au volume de sérum nécessaire pour produire l'hémolyse complète H3.

La moyenne chez les sujets normaux se trouve au tube VIII.

TABLEAU 9

Titration du complément par la méthode de RANQUE

Tubes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3
Sérum à étudier convenable- ment dilué	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
Eau physiologique	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,00
Eau physiologique avec rhéo- mètre	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Hématies sensibilisées	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Total...	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Une demi-heure à 37°															
Lecture (exemple)	H0	H0	H0	H0	H1	H1	H2	H2	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3

Au-dessous du tube VI, les sujets sont hyperalexiques; au-dessus de X, l'alexine peut être considérée comme diminuée.

Remarques sur des réactifs :

Le sérum à titrer est dilué de façon convenable :

1/16 pour le cobaye,

1/3 pour l'homme.

La suspension globulaire d'hématies de mouton est standardisée : on lyse 0,75 cm³ de la suspension dans 1,25 cm³ d'eau distillée; la solution d'hémoglobine obtenue doit avoir un indice optique de $n = 0,00155$ au photomètre de Vernes.

L'auteur se réfère au tableau de G. CAUDE donnant la valeur du pourcentage d'hémoglobine d'après les valeurs de n .

Le sérum hémolytique est du sérum de cheval anti-mouton.

On détermine l'unité hémolytique par rapport à 0,75 cm³ de suspension globulaire et du sérum de cobaye.

On sensibilise avec 3 unités hémolytiques pour 0,75 cm³ de suspension globulaire.

L'auteur utilise une concentration importante d'hémolysines pour atténuer l'erreur due à l'hémolysine naturelle anti-mouton.

III

BASES DE LA DETERMINATION DE L'UNITE 50 %

Les chercheurs modernes sont d'accord pour penser que le point d'hémolyse à 50 % est le point optimum de comparaison pour une étude quantitative du complément.

Déjà, en 1919, BROOKS (18) soulignait qu'« en choisissant l'hémolyse complète comme critère, les immunologistes ont choisi, non pas le point final le plus exact, mais le moins précisément déterminable.

Non seulement, il est impossible de faire une interpolation entre la plus faible concentration produisant une hémolyse complète et

celle qui ne peut produire d'hémolyse, mais quand l'hémolyse est presque complète, de grands changements dans la quantité de complément produit de faibles différences dans le pourcentage d'hémolyse ».

L'établissement des courbes d'hémolyse permet de se rendre compte que le phénomène hémolytique se déroulait suivant un processus qui s'exprime par une courbe en forme de S.

D'après les courbes d'hémolyse, établies en portant en abscisses les quantités croissantes de complément et en ordonnées, les pourcentages d'hémolyse, on peut constater ceci :

Au début de la réaction, des valeurs croissantes de complément produisent d'abord des degrés voisins d'hémolyse; puis, pour des valeurs de 30 à 70 % d'hémolyse, la courbe est sensiblement une droite et, en dernier, il faut des accroissements relativement importants de sérum pour hémolyser totalement les globules.

Les pourcentages d'hémolyse sont calculés en faisant le rapport de la densité optique de la solution d'hémoglobine de chaque tube de la réaction, à la densité optique de la solution d'hémoglobine correspondant au tube où tous les globules sont lysés et qu'on nomme par extension : l'hémolyse 100 %.

L'usage de photolorimètre et de spectrophotomètre, si cela est possible, permet de faire ces mesures avec exactitude.

Dans la zone comprise entre 30 et 70 %, la réaction entre complément et globules rouges sensibilisés se traduit par une relation linéaire : le moindre changement de valeur du complément produisant une différence notable du degré d'hémolyse. En choisissant, comme point final de la réaction, l'hémolyse à 50 %, les chercheurs se sont donc placés dans les meilleures conditions de sensibilité.

Ces dernières années, des méthodes de titrage du complément ont été mises au point, dans lesquelles on exprime une unité 50 % qui représente la quantité de sérum produisant une hémolyse à 50 %.

WADSWORTH (131), qui mit le premier en pratique l'estimation du titre du complément en unité 50 %, montra l'exactitude de ce protocole par cette expérience : soit deux compléments différents, quand le point d'hémolyse complète est pris comme unité d'activité, les

courbes exprimant leur activité à différents points d'hémolyse partielle différent largement.

Quand on utilise le point d'hémolyse 50 %, les courbes sont à peu près identiques.

Une expression mathématique du phénomène hémolytique a été donnée par VON KROGH (130) qui mit au point la formule suivante :

$$x = K \left(\frac{y}{1 - y} \right)^{1/n}$$

Dans cette équation, x représente la quantité de complément (cm³ de sérum dilué).

y = le degré d'hémolyse (100 y = hémolyse 100 %).

La constante K est l'unité 50 % ; en effet quand

$$y = 0,5, \frac{y}{1 - y} = 1 \text{ et } x = K$$

La constante 1/n détermine l'allure de la courbe.

On a montré que sa valeur est de $0,2 \pm 10 \%$. Les déterminations expérimentales des variations de ce facteur ont été faites en utilisant la forme logarithmique de l'équation de VON KROGH.

La formule de VON KROGH traduit bien l'hétérogénéité des globules sensibilisés à la lyse.

Certains auteurs ont utilisé la formule de VON KROGH sous sa forme logarithmique pour déterminer la valeur de l'unité 50 %, la formule devient :

$$\text{Log } x = \text{log } K + 1/n \log \left(\frac{y}{1 - y} \right)$$

La courbe représentative est une droite de pente 1/n et d'ordonnée à l'origine log k.

C'est ainsi que KENT, BUKANTZ et REIN (63) se servent de cette formule qui permet de trouver la valeur de l'unité 50 % connaissant un seul point d'hémolyse partielle, sans construire de courbe d'hémolyse.

L'utilisation de cette formule ne peut se faire que si l'on connaît la valeur numérique du paramètre $1/n$ qui peut varier selon les conditions expérimentales.

HEIDELBERGER et MAYER (79) l'utilisèrent aussi, mais dans des travaux ultérieurs (mise au point d'une réaction de fixation du complément titré à 50 % (81) et étude de l'action activante du magnésium (80), emploient une méthode simplifiée par l'usage de facteurs de conversion.

Ces facteurs ont été utilisés tout d'abord par WADSWORTH et les MALTANER (131) dans les réactions de fixation pour le diagnostic de la syphilis et de la tuberculose.

Les facteurs de conversion sont obtenus de la façon suivante : si on donne à la quantité de complément nécessaire pour produire 50 % d'hémolyse, la valeur 1 et si $1/n=0,2$, l'équation de VON KROGH devient :

$$x = \left(\frac{y}{1 - y} \right)^{0,2}$$

L'expression donne x = le rapport de la quantité de complément donnant un degré d'hémolyse y à 1, la quantité de complément produisant 50 % de lyse.

Les facteurs de conversion permettent de calculer le titre d'un complément en unités 50 % par une seule mesure d'hémolyse partielle : en multipliant par le facteur x le volume de complément donnant le degré d'hémolyse y ; soit l'exemple suivant donné par KABAT et MAYER (62) : si un centimètre cube d'une dilution de sérum à 1 % produit 30 % d'hémolyse ($y=0,3$), son activité est de $100 \times 0,844 = 844$ unités.

(La valeur unité se trouve en divisant le taux de dilution, ici 100, par le volume de dilution utilisé, ici 1.)

Dans le tableau suivant, se trouvent rassemblées les valeurs des facteurs de conversion pour des degrés d'hémolyse de 0,10 à 0,90.

TABLEAU 10

*Facteurs de conversion calculés d'après l'équation
de VON KROGH pour $1/n=0,2$*

Degré de lyse	Facteur	Degré de lyse	Facteur
0,10	0,644	0,55	1,041
0,12	0,671	0,60	1,084
0,14	0,696	0,65	1,132
0,16	0,718	0,70	1,185
0,18	0,738	0,75	1,246
0,20	0,758	0,80	1,320
0,25	0,803	0,82	1,354
0,30	0,844	0,84	1,393
0,35	0,884	0,86	1,438
0,40	0,922	0,88	1,490
0,45	0,961	0,90	1,552
0,50	1,000		

Méthode graphique.

Comme l'a déjà fait ROULIER (115) en France, nous utilisons la méthode graphique pour trouver la valeur de l'unité 50 % : c'est-à-dire que, sur un papier millimétré, on porte en abscisse les valeurs de complément (dilution de sérum en cm³) et, en ordonnée les pourcentages d'hémolyse, calculés en déterminant le rapport de la densité optique du liquide contenu dans les tubes à réaction, à la densité optique du liquide où l'hémolyse est totale.

On trace la courbe d'hémolyse en reliant les différents points expérimentaux, et, par simple lecture on obtient la valeur de l'unité 50 %

Comme le fait remarquer ROULIER, le calcul de l'unité 50 % devient indépendant de la valeur de $1/n$ que les différents chercheurs ont trouvée variable, sans que l'on puisse toujours prévoir et mesurer ces variations.

Nous indiquerons ici le protocole opératoire suivi par ROULIER pour titrer le complément de cobaye en unités 50 %, en vue d'une réaction quantitative de fixation du complément dans le cas de la syphilis.

TITRAGE DU COMPLÉMENT PAR ROULIER

Le système hémolytique est un système anti-mouton. La suspension d'hématies est soigneusement standardisée.

Le titrage du sérum hémolytique est effectué dans des conditions bien définies. Il se fait en deux temps :

— on recherche d'abord, la *dose minima active de complément* correspondant au sérum hémolytique étudié : on calcule l'unité 50 % d'un complément en présence d'un très fort excès de sérum hémolytique.

— on recherche ensuite, la *dose optima d'hémolysine* en présence de l'unité 50 % ainsi calculée : cette dose optima est la dose la plus faible permettant d'obtenir encore 50 % d'hémolyse en présence de cette quantité fixe et connue de complément.

Pour le titrage, on utilise deux doses optima de façon que l'unité 50 % soit la plus petite possible, donnant à la réaction d'hémolyse sa sensibilité maxima.

TABLEAU 11

Numéro des tubes....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Complément au 1/100 ^e	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	—
Eau salée à 0,85 %.....	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	1	1,50
G. R. sensibilisés..... (standardisés)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50

45' à 37° ; centrifugation ; lecture photométrique du pourcentage d'hémolyse

Après cette revue rapide des principales méthodes de dosage de l'alexine humaine, nous citerons deux autres méthodes dont les modalités sont différentes :

— celle de M^{me} AUBEL-LESURE (5) basée aussi sur un processus hémolytique, mais dans laquelle on apprécie le pouvoir complémentaire au nombre d'hématies hémolysées.

— celle de HEIDELBERGER (56), méthode d'analyse chimique rigoureuse mais d'application délicate.

DOSAGE DE COMPLÉMENT PAR M^{me} AUBEL-LESURE

Le dosage consiste à déterminer le nombre d'hématies de mouton qu'un sérum est capable d'hémolyser en mettant en présence, pendant 60 minutes à 37° une quantité fixe de sérum et des quantités croissantes d'hématies de mouton sensibilisées.

Les hématies sont sensibilisées en mélangeant à parties égales une dilution de sérum hémolytique renfermant 5 unités hémolytiques dans 0,1 cm³ avec une suspension d'hématies contenant 1.000.000 d'hématies par mm³. On laisse 10 minutes à 37° et on porte ensuite à + 4°.

Chaque essai comporte 4 tubes.

	1	2	3	4
Suspension d'hématies sensibilisées.....	0,4	0,4	0,4	0,4
Alexine (sérum humain ou sérum de lapin)	0,4	0,4	—	—
Eau physiologique.....	0,2	0,2	0,6	0,6

1 heure à 37° puis au réfrigérateur

Le degré d'hémolyse est déterminé en comptant le nombre d'hématies non hémolysées par mm³.

Par différence avec le nombre d'hématies contenues dans les deux autres tubes (3, 4), on obtient le nombre d'hématies hémolysées par le sérum dans un mm³.

DÉTERMINATION QUANTITATIVE DU COMPLÉMENT

PAR LA MÉTHODE DE HEIDELBERGER

Précédemment nous avons signalé que HEIDELBERGER (56), se basant sur la propriété du complément de se fixer sur les précipités spécifiques, avait pu mesurer l'azote du complément.

En effet, c'est bien le complément hémolytique qui est absorbé par les précipités spécifiques car le liquide surnageant n'hémolyse plus les hématies sensibilisées.

Des essais ont montré que l'azote du complément par cm^3 de sérum dépend de la quantité de complément utilisé dans l'analyse; il est progressivement plus faible, quand des quantités plus grandes de complément sont employées, en dépit d'une perte complète de complément, comme on le vérifie par l'absence de l'activité hémolytique dans le liquide surnageant. Ceci est illustré par la figure suivante empruntée à HEIDELBERGER.

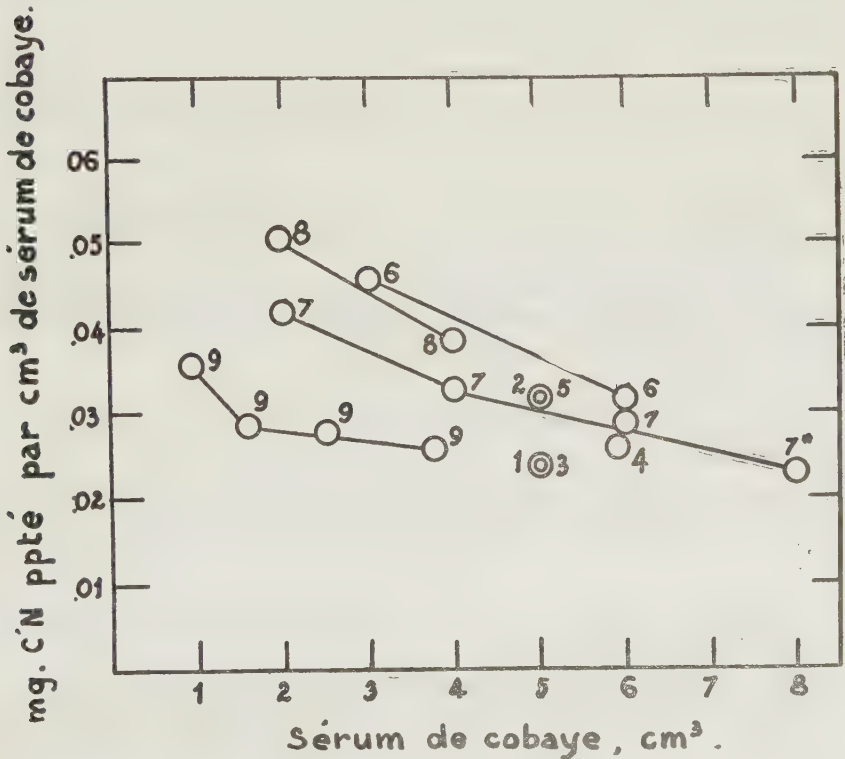


FIGURE 3

Quantité d'azote du complément (C'1 N) précipité, en fonction du volume de sérum de cobaye utilisé.

Se basant sur ces considérations, l'auteur a mis sur pied une méthode chimique de dosage du complément.

Une partie du sérum est inactivée à 56° (iC'), pendant 50 min., au lieu de 30 min., car il est établi que la période standard de 30 minutes ne suffit pas à réduire au minimum la quantité d'azote fixée par le précipité spécifique à partir du complément inactivé.

Sérums frais et inactivé sont centrifugés pendant plusieurs heures avant d'être utilisés.

Le sérum de lapin anti-pneumocoque type III contenant 1,0 mg d'azote (anticorps) par cm^3 de dilution, est dilué, neutralisé et inactivé. On le mélange à parties égales avec une solution de polysaccharide spécifique homologue contenant 0,04 mg par cm^3 .

On effectue trois essais : avec le complément actif (C'), le complément inactivé (iC') et avec de l'eau physiologique comme véhicule du système immune.

On fait des témoins de C et de iC' avec immunsérum seul et avec polysaccharide seul. On fait aussi un témoin de l'immunsérum seul.

Les mélanges sont maintenus à la température du laboratoire pendant une heure, ou plus si l'agrégat se produit pas après une heure dans les tubes contenant le complément actif.

Les tubes sont alors centrifugés et les précipités lavés trois fois et analysés.

On fait la moyenne de l'azote obtenu dans les tubes témoins de iC' et on soustrait de l'azote du précipité spécifique dans les tubes iC'.

D'autre part, l'azote des témoins de C' est déduit de l'azote du précipité spécifique avec C'.

Enfin, on soustrait iC'N et C'N, ce qui donne 0,12 mg. d'azote.

Cette valeur équivaut à 0,024 mg par cm^3 de sérum (on emploie dans le dosage 5 cm^3 de sérum).

Le protocole est schématisé dans le tableau 12.

Cette méthode est certainement d'une grande exactitude mais son application pratique n'est guère facile.

TABLEAU 12
Détermination quantitative du complément
par la méthode HEIDELBERGER

Tubes.....	1	1	2	1	1	3	3	3
Complément, cm3.....	4,0	4,0						5,0
iC', cm3.....			3,0	3,0			5,0	
Dilution de sérum.....	0,8		1,0	0,6		1,0	1,0	1,0
Dilution de S III.....		0,8			0 6	1,0	1,0	1,0
N précipité, mg.	0,012	0,016	0	0,018	0,020	0,584	0,634	0,740
						0,586	0,636	0,736
Moyenne.....	0,014			0,019		0,588	0,632	0,728
Soustraction des témoins.....						0	(1) 0,032	(2) 0,018
N des précipités spécifiques.....						0,588	0,600	0,720
Soustraction de iC'N								0,600
C'N précipité, mg.								0,12

(1) $0,019 \times 5/3$.

(2) $0,014 \times 5/4$.

II

DETERMINATION DE L'ALEXINEMIE HUMAINE PAR UTILISATION DU SERUM DE COBAYE ANTI-GLOBULES ROUGES HUMAINS

Imaginée par notre maître H. DIACONO, cette technique a déjà fait l'objet d'une récente publication (30, 31). Les caractéristiques de cette technique sont les suivantes :

1° Comme l'a fait, dans le même but, VARGUES (127) en France, le matériel antigénique est constitué par des hématies humaines.

2° L'anticorps hémolytique correspondant est fourni par un sérum de cobaye convenablement préparé, et dont l'alexine — après inactivation — est remplacée par l'alexine humaine que l'on se propose de titrer.

Par chauffage du sérum de cobaye anti-homme, nous laissons intacte — outre l'hémolysine homologue — la fraction thermostable de l'alexine, c'est-à-dire, C'3 et C'4, de cet antisérum.

Ces deux éléments se trouvent ainsi, dans ce procédé de dosage, surajoutés aux 4 constituants normaux de l'alexine humaine (C'1, C'2, C'3 et C'4).

Si l'on tient compte des facteurs par lesquels se différencie l'alexine humaine de l'alexine de cobaye (la première étant, comme on le sait, plus riche en C'1 et plus pauvre en C'2), le renforcement en C'3 et C'4, qu'apporte le sérum de cobaye anti-homme chauffé, permet, en définitive, de titrer, par le procédé que nous proposons, le constituant qui est à la dose la plus faible (C'2) : ce qui revient à doser le facteur par lequel se caractérise l'alexine humaine, son « limiting component ».

3° Du fait que le sérum frais de cobaye anti-homme renferme, à la fois, alexine et sensibilisatrice, on peut déterminer son activité hémolytique, en faisant agir directement ce sérum frais, à doses croissantes, sur une quantité fixe de globules rouges humains. Pour une certaine quantité de sérum de cobaye frais, l'hémolyse des globules rouges en présence est complète. La dose limite ainsi déterminée constitue l'*index hémolytique* du sérum utilisé.

Dans cette dose définie par l'index hémolytique, les deux constituants — anticorps et alexine — se trouvent harmonieusement et naturellement combinés.

L'alexine, pour sa part, sans le jeu d'aucun calcul, intervient dans le phénomène lytique à la *dose optima* pour l'effet produit. Cette alexine est l'alexine du propre cobaye producteur de l'antisérum.

Si nous chauffons ce sérum de cobaye anti-homme à 56° pendant une demi-heure, de façon à le priver de son alexine (ou du moins

de ses constituants thermolabiles) et si nous ajoutons de l'alexine humaine, nous reconstituons le complexe hémolytique susceptible d'hémolyser, dans les mêmes conditions opératoires, la même quantité de globules rouges.

Le mode de titrage proposé consiste, en fait, à déterminer la dose d'alexine humaine pouvant se substituer à la dose d'alexine de cobaye combinée à l'anticorps spécifique, pour permettre à cet anticorps d'exercer son activité normale.

Or, à la suite d'essais dont nous rapportons les résultats plus loin, il nous a été permis de constater que la dose de sérum hémolytique anti-homme chauffé à introduire dans notre réaction pour sensibiliser les hématies et pour doser une alexine, correspondait en volume à la dose de sérum frais anti-homme représentant l'index hémolytique.

Cette observation apporte une simplification et une commodité au point de vue opératoire.

Comme dans les méthodes sérologiques habituelles, nous avons établi notre protocole opératoire, en prenant comme unité d'activité, la quantité limite de sérum humain frais susceptible de produire l'hémolyse complète d'une quantité fixe de globules rouges sensibilisés.

Toutefois, comme nous l'avons indiqué précédemment, selon les travaux de ces dernières années, ce point d'hémolyse totale n'apporte pas un critère d'ordre quantitatif suffisamment nuancé pour l'estimation du phénomène de l'hémolyse.

En nous inspirant des techniques américaines, une autre technique a été mise au point afin de définir une unité d'hémolyse à 50 % et d'exprimer le titre d'un sérum humain en unités 50 %.

Le sérum de cobaye anti-globules rouges humains a été préparé et utilisé également par GERMAN et BORY (47) dans la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la syphilis.

MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

Le sérum frais et dilué, dont on veut titrer l'alexine, est ajouté, à doses croissantes, dans un système équilibré contenant une dose

constante d'hématies et une dose constante de sérum hémolytique. Ces derniers éléments sont amenés à un titre défini de façon que le seul élément variable demeure l'alexine.

Le véhicule de tous les réactifs est de l'eau physiologique à 9 g. ‰ renfermant, en outre 0,50 g. de sulfate de magnésium.

Sérum à titrer.

Le sujet doit être à jeun au moment de la ponction.

Le sérum est séparé du caillot par centrifugation et le titrage doit être effectué dans les 24 heures qui suivent la prise de sang.

Le sérum est dilué au 1/10^e avec de l'eau physiologique, quand on prend comme terme de la réaction, l'hémolyse totale.

Quand on fait une lecture à 50 % d'hémolyse, le sérum est dilué à 1/100^e, de façon à avoir plusieurs points expérimentaux d'hémolyse partielle.

Les dilutions ne doivent être faites qu'au moment du titrage.

La suspension globulaire.

Les hématies humaines du groupe 0 sont obtenues à partir de sang incoagulable, ou bien à partir de caillots que l'on dilacère avec un peu d'eau physiologique. La purée globulaire est passée sur une gaze puis centrifugée. Le liquide surnageant est décanté et le culot est lavé trois fois, avec au moins 20 fois son volume d'eau physiologique.

Il est primordial de fixer la concentration de la suspension globulaire à un taux défini, c'est-à-dire de la standardiser.

Nous effectuons une suspension approximativement à 2 % du culot d'hématies et nous procédons à une lecture photométrique de la solution d'hémoglobine obtenue en lysant une partie aliquote de cette suspension.

Ainsi 0,6 cm³ des globules rouges sont lysés avec 3,4 cm³ de solution de carbonate de sodium à 1 ‰. Le liquide est examiné à l'Electrophotomètre de Meunier (écran vert et 2 surcharges) et on doit trouver une densité optique de 150 (divisions du tambour).

La teinte obtenue correspond à une concentration en hémoglobine de  75 mg %.

Cette solution alcaline permet d'obtenir des solutions d'hémoglobine relativement stables (quelques heures).

Sérum hémolytique.

Le sérum hémolytique est constitué par du sérum de cobaye anti-globules rouges humains.

Les cobayes, mâles de préférence, pesant à peu près 500 g., reçoivent 4 à 5 injections préparantes de 1 cm³ de purée globulaire. La purée globulaire est obtenue comme pour la préparation de la suspension globulaire.

Il est indiqué de la tiédir à 37° avant de l'injecter.

On fait ensuite une injection de rappel chaque semaine.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque de l'animal à jeun. On laisse coaguler et on centrifuge pour recueillir le sérum qui est alors soumis au titrage.

DÉTERMINATION DE L'INDEX HÉMOLYTIQUE

DU SÉRUM DE COBAYE ANTI-HOMME

Ce sérum de cobaye anti-homme renferme à la fois de l'alexine et des hémolysines anti-globules rouges humains. Sa capacité hémolytique est déterminée par rapport à une dose fixe de globules rouges de concentration définie.

Nous cherchons, ainsi, quelle est la dose limite de sérum hémolytique capable d'*hémolyser complètement* une quantité constante de suspension globulaire, dans les mêmes conditions de concentration que dans le titrage de l'alexine elle-même.

Cette dose limite constitue ce que nous appelons l'index hémolytique de notre anti-sérum. Dans cette quantité de sérum, alexine et hémolysine coopèrent pour lyser complètement les hématies. *Quand le sérum a été chauffé à 56°, c'est-à-dire privé de son alexine, nous cherchons à restaurer la capacité hémolytique de cette dose « unité hémolytique », par une quantité optima de sérum humain.* C'est dans cet ordre d'idée que nous avons fixé notre protocole opératoire, après avoir effectué de nombreux essais, que nous relatons plus loin, sur la loi de suppléance.

Aussi bien pour la détermination de l'unité d'hémolyse complète que pour l'unité d'hémolyse à 50 %, nous sensibilisons les hématies avec une dose de sérum hémolytique correspondant à l'index hémolytique.

TABLEAU 13
Détermination de l'index hémolytique du sérum
de cobaye anti-homme

	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3
Sérum de cobaye anti-homme au 1/10.....	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80
Eau physiologique.....	1,30	1,20	1,10	1,0	0,90	0,80	0,70	0,60
Globules rouges 2 %...	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
1/2 heure à 37°								

Les réactifs sont distribués à l'aide de pipettes de 1 cm³ au 1/100, nettoyées au mélange sulfochromique.

La suspension globulaire est préparée et standardisée colorimétriquement comme pour le titrage de l'alexine. Elle est distribuée à l'aide d'un rhéomètre.

Au bout d'une demi-heure à 37°, la réaction est terminée. Nous examinons les tubes devant la lampe, que nous décrivons plus loin dans la partie de notre travail consacrée à la détermination de l'unité d'hémolyse 100 % et qui nous permet d'apprécier l'hémolyse totale.

Nous nous arrêtons au premier tube où l'hémolyse est totale.

L'index hémolytique varie de 0,30 à 0,50 cm³ de sérum de cobaye anti-homme dilué au 1/10°. C'est avec cette dose limite que nous sensibilisons les hématies.

Sensibilisation des hématies.

Elle s'opère en laissant en contact pendant 1/4 d'heure à la tem-

pérature du laboratoire, 0,40 cm³ de sérum de cobaye anti-globules rouges humains, chauffé à 56° et convenablement dilué (d'après l'index hémolytique) et 0,60 cm³ de la suspension globulaire, par tube à réaction.

Dans la pratique, on prépare le mélange pour la série de 10 tubes dans un Bécher et on distribue ensuite à l'aide d'un rhéomètre calibré 1 cm³ dans chaque tube.

DÉTERMINATION DE L'UNITÉ D'HÉMOLYSE TOTALE

PROTOCOLE OPÉRATOIRE

Dans chacun des 10 tubes à réaction, on introduit successivement :

— le sérum humain dilué au 1/10^e avec de l'eau physiologique magnésinée;

— de l'eau physiologique magnésinée en quantité suffisante pour compléter à 1 cm³;

— 1 cm³ de globules rouges sensibilisés.

On mélange par agitation et on place les tubes au thermostat à 37°

TABLEAU 14

Titrage de l'alexine humaine en unités d'hémolyse 100 %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3
Sérum humain 1/10 ^e	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,0
Eau physiologique magnésinée	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,0
Globules rouges sensibilisés	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1/2 heure à 37°										

Au bout d'une 1/2 heure, on lit les résultats. Le tube où l'hémolyse est complète, est pris comme unité.

En moyenne, l'hémolyse complète se produit au 3^e ou au 4^e tube, c'est-à-dire pour une quantité de sérum humain de 0,03 à 0,04 cm³.

Nous exprimons ces résultats en unités : le nombre d'unités est donné par le rapport de 1 cm³ sur la quantité de sérum, en cm³, qui a produit l'hémolyse.

Par exemple, si l'hémolyse totale se produit au 4^e tube, c'est-à-dire, pour 0,04 cm³ de sérum, nous dirons que ce sérum titre $1/0,04 = 25$ unités d'hémolyse : 100 %.

Comme il est assez arbitraire d'apprécier l'hémolyse totale à l'œil nu, nous utilisons un petit dispositif d'éclairage que nous avons mis au point.

Ce dispositif comprend un tube fluorescent (tube Philips) encastré dans un coffre en contre-plaqué, dont une des faces est remplacée par un mica sillonné de traits à l'encre de Chine. Ces bandes noires ont deux mm. de large et sont espacées de cinq mm.

On place le portoir devant cette source lumineuse et, lorsque l'hémolyse est totale, on doit voir nettement, à travers le liquide, les traits d'encre de Chine. Le moindre trouble dans un tube se perçoit parfaitement.

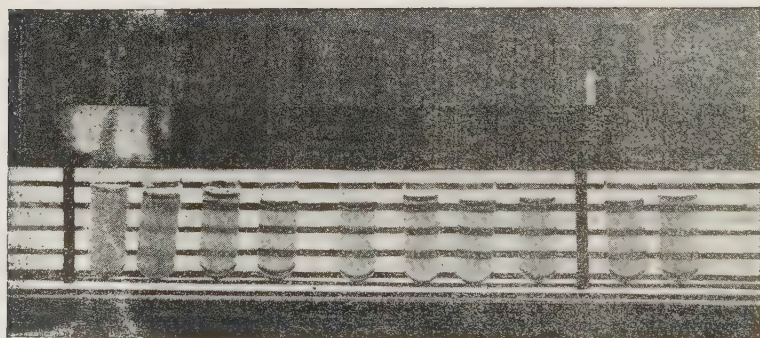


FIGURE 4

RELATION ENTRE INDEX HÉMOLYTIQUE ET DOSAGE DE L'ALEXINE

Sérums de cobayes anti-globules rouges humains	Dosage de l'alexine de sérums humains (technique de l'hémolyse totale) par utilisation — pour la sensibilisation des hématies — de la dose d'antisérum chauffé correspondant à la dose du même antisérum frais déterminée par l'index hémolytique.
Détermination de l'index Hémolytique (cm3 sérum pur)	
0,04	0,04
0,04	0,04
0,06	0,05
0,03	0,03
0,03	0,03
0,03	0,03
0,035	0,04
0,03	0,04
0,04	0,04
0,04	0,04
0,04	0,03
0,04	0,04
0,04	0,05
0,04	0,03
0,04	0,04
0,04	0,06 (accès palustre)
0,04	0,04
0,04	0,04
0,04	0,06 (tuberculose)
0,04	0,05
0,04	0,04
0,04	0,04
0,04	0,05
0,04	0,04
0,04	0,05
0,04	0,02 (hépatonéphrite)
0,04	0,04
0,04	0,05
0,04	0,04

Il résulte des résultats enregistrés dans ce tableau que, lorsque l'alexinémie humaine est *normale*, le volume de sérum humain frais, remplaçant l'alexine dont a été amputée, par chauffage, un sérum de cobaye anti-globules rouges humains correspond au volume de l'antisérum frais dont on a déterminé l'index hémolytique.

DÉTERMINATION DE L'UNITÉ D'HÉMOLYSE 50 %

PROTOCOLE OPÉRATOIRE

Les réactifs sont ceux que l'on utilise pour la détermination de l'unité d'hémolyse totale, seul le sérum humain est dilué à 2 % ou à 1 % s'il est hyperalexique.

La dose de sérum hémolytique doit être exactement celle donnée par l'index hémolytique, le moindre excès se traduisant par des différences notables de l'unité 50 %.

Comme nous l'avons indiqué, c'est par rapport à la dose de sérum de cobaye anti-homme correspondant à l'index hémolytique que nous dosons l'alexine humaine. Nous ne cherchons pas la dose limite active de complément mais la dose de complément qui amène la lyse de 50 % des globules rouges dans un système hémolytique équilibré dont nous avons défini les caractéristiques et les constituants.

Les réactifs sont introduits dans les tubes dans l'ordre indiqué par le tableau.

TABLEAU 15

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3	cm3
Sérum humain 2 %.....	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,0
Eau physiologique + Mg....	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,0
Globules rouges sensibilisés.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1/2 heure à 37° C.										

Au cours du séjour au bain-marie, il est recommandé d'agiter les tubes, toutes les dix minutes, à peu près, pour éviter la sédimentation des globules.

Au bout d'une 1/2 heure, les tubes sont refroidis dans un bain d'eau froide pour arrêter l'hémolyse.

On centrifuge et on lit la densité optique du liquide surnageant.

Le degré d'hémolyse dans chaque tube, est donné par le rapport de la densité optique du liquide examiné à celle du tube où l'hémolyse est totale.

Personnellement, nous utilisons l'Electrophotomètre de Meunier, avec écran vert et les deux surcharges.

La sensibilité de l'appareil nous oblige à diluer les liquides d'hémolyse partielle de moitié.

Dosage de l'hémoglobine à l'électrophotomètre de Meunier

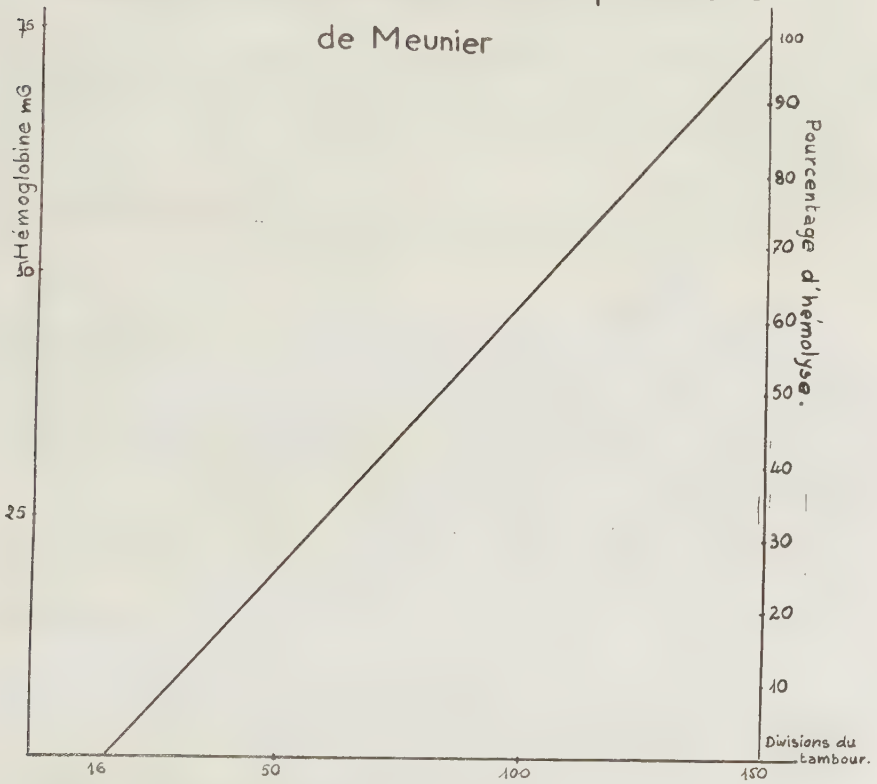


FIGURE 5

Degré d'hémolyse.

Les degrés d'hémolyse partielle sont connus directement, d'après les divisions de l'Electrophotomètre.

En effet, dans la standardisation de la suspension globulaire, nous

prenons $0,6 \text{ cm}^3 + 3,4 \text{ cm}^3$ d'eau carbonatée; la solution d'hémoglobine obtenue doit donner 150 divisions au tambour.

Dans les tubes à réaction, nous avons $0,6 \text{ cm}^3$ sous un volume de 2 cm^3 . Au moment de la lecture, nous diluons de moitié, de sorte que pour 100 % d'hémolyse, nous devons avoir 150 divisions.

D'autre part, nous avons dressé une courbe de dosage de l'hémoglobine de notre appareil, en tenant compte de l'absorption de la solution de base. C'est une relation linéaire, avec en abscisses les divisions du tambour et en ordonnées les taux d'hémoglobine.

Sachant que le taux d'hémoglobine correspondant à 150 divisions, donne 100 % d'hémolyse, nous avons divisé l'axe des ordonnées en 10, chaque dixième représentant 10 %, 20 %, 30 % 100 % d'hémolyse.

Ceci nous permet de trouver, directement, le degré d'hémolyse, d'après le nombre de divisions du tambour trouvé.

Courbe d'hémolyse.

Les différents points expérimentaux permettent de tracer la courbe d'hémolyse, qui, nous l'avons déjà vu, est en forme de S. L'allure de la courbe diffère suivant que le sérum est hyperalexique, normal ou hypoalexique, comme on peut le constater par les exemples donnés (figure 6).

Pratiquement, deux points d'hémolyse compris entre 30 % et 70 % suffisent pour tracer la droite représentative.

L'abscisse du point d'ordonnée 50 % qui rencontre la courbe donne la quantité de sérum qui produit 50 % d'hémolyse.

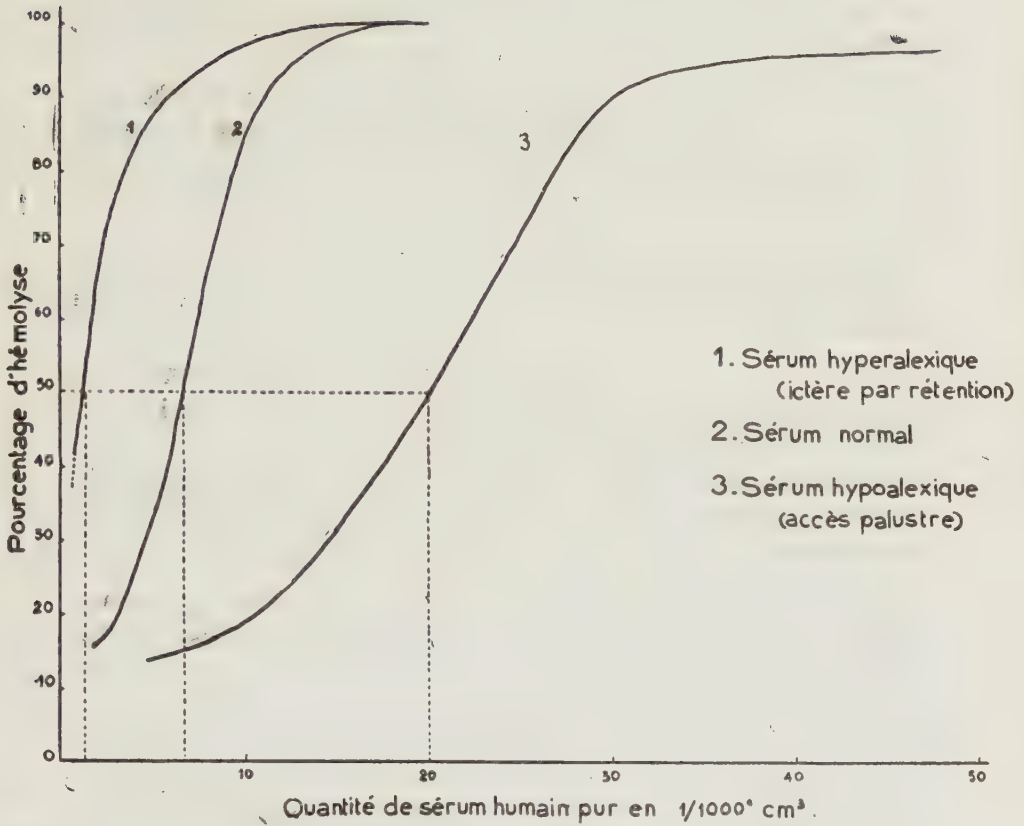
Le titre est exprimé en unités, calculées comme pour l'hémolyse totale.

En moyenne, l'hémolyse à 50 % se produit pour des doses de sérum humain variant de $0,01 \text{ cm}^3$ à $0,0025 \text{ cm}^3$, ce qui représente de 100 à 400 unités.

Au-dessous de 100 unités le sérum est considéré comme hypoalexique.

Au-dessus de 400 unités, le sérum est considéré comme hyperalexique.

FIGURE 6



ETUDE ANALYTIQUE DES FACTEURS
QUI INFLUENCENT LA RÉACTION D'HÉMOLYSE

LE VÉHICULE.

Le véhicule utilisé pour tous les réactifs est de l'eau physiologique à 9 ‰ renfermant 0,50 g. de sulfate de magnésium.

Il est indiqué d'employer de l'eau bidistillée ou bien de l'eau distillée dans un appareil en verre.

L'eau distillée dans des alambics en cuivre peut contenir des traces de cuivre, et l'on sait que les ions cuivrîques ont la propriété d'agglutiner les hématies.

Nous avons vérifié cet effet agglutinant sur les hématies de mouton : il y a, rapidement, agglutination de 0,4 cm³ de sang de mouton lavé avec 1 cm³ de solution physiologique renfermant 0,10 g. ‰ de sulfate de cuivre.

Effet activant des ions Mg++.

Nous avons déjà signalé l'action favorisante des ions Mg++ dans le phénomène hémolytique.

Cette action a été particulièrement bien étudiée par MAYER et ses collaborateurs (80) qui ont montré que cet effet favorisant était sensible à partir de faibles doses (0,46 γ).

Pour notre part, dans un premier essai, nous avons ajouté dans les tubes à réaction 60 γ et 108 γ (en remplaçant une partie de l'eau physiologique par une solution de sulfate de magnésium).

L'effet activant est très net : c'est ainsi que le titre du sérum, déterminé sans addition de Mg, était de 20 unités et passe à 33,3 unités.

Cependant, pour ne pas compliquer le protocole opératoire, nous avons préparé une eau physiologique renfermant 0,50 g. de sulfate de magnésium (SO₄ Mg, 7 H₂O) comme véhicule de tous les éléments du dosage, ce qui revient à ajouter approximativement par tube, 100 γ d'ions Mg++.

Nos résultats sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU 16
Influence des ions Mg++

Sérums humains	Alexinémie en unités 100 ‰		Activation ‰
	sans Mg++	avec 100 γ Mg++	
1	20	33,3	66,5
2	20	33,3	66,5
3	20	33,3	66,5

Effet du sérum chauffé.

Certains auteurs, et ROULIER (114) en particulier, ont montré que le sérum chauffé ajouté dans un système hémolytique avait une action favorisante, qui serait due à l'apport de grosses molécules protéiques réalisant un certain équilibre colloïdal.

WADSWORTH (131) propose d'utiliser, quand le complément doit être très dilué, du sérum de cobaye inactivé et dilué comme véhicule et non pas de l'eau physiologique. L'auteur a remarqué que le manque de constituants du sérum modifiait le cours de l'hémolyse.

Nous avons entrepris des essais dans ce sens, mais nous n'avons pas eu de modification dans nos résultats.

Nous avons déterminé le titre alexique d'un sérum humain, selon le protocole décrit. Puis, dans une autre série de tubes à réaction, nous avons ajouté une dose constante de sérum humain inactivé (à la place d'eau physiologique). Le titre du sérum examiné, ainsi déterminé, n'a pas subi de variation.

D'autre part, dans une détermination de l'unité d'hémolyse 50 %, la dilution de sérum humain à 2 % a été faite avec une dilution de sérum humain inactivé. La courbe d'hémolyse obtenue est la même que celle obtenue quand le sérum est dilué avec de l'eau physiologique.

SUSPENSION GLOBULAIRE.

La concentration a été fixée à 2 % de culot de centrifugation. Elle donne, dans les conditions où nous opérons, un liquide d'hémolyse suffisamment coloré.

Si l'on force la concentration, la réaction devient moins sensible : ainsi, un sérum titrant 33,3 unités 100 % dans un système contenant des hématies à 2 %, ne titre que 20 unités, quand la concentration est de 3,2 %.

Agglutinogènes.

Nous avons déjà donné la raison pour laquelle nous utilisons de préférence, des hématies du groupe O.

De plus, nous nous sommes proposés de voir si l'agglutinogène pouvait intervenir en quelque manière. Nous avons titré quelques

sérums humains avec des globules rouges appartenant à des groupes différents et nous n'avons noté aucune différence, comme on peut le constater dans le tableau suivant :

TABLEAU 17
Influence de l'agglutinogène

Sérum humains	Groupe sanguin	Alexinémie (unités 100 %)		
		Hématies O	Hématies A	Hématies B
1	O	25	25	
2	A		16,6	16,6
3	B		16,6	16,6
4	O	33,3		33,3
5	B	20		20

Ces essais permettent de constater qu'il est sans importance d'employer des hématies d'individus différents.

SÉRUM HÉMOLYTIQUE.

1° *Absence d'hémolysines naturelles anti-homme dans le sérum de cobaye :*

Nous avons vérifié que le sérum de cobaye ne renferme pas des hémolysines anti-homme.

En faisant agir du sérum de cobaye neuf, à doses croissantes sur des globules rouges humains O, il ne se produit aucune hémolyse ni agglutination.

Cependant, dans les sérums de cobaye anti-homme, préparés avec des globules rouges humains, possédant un agglutinogène A ou B, à côté des hémolysines apparaissent des agglutinines anti A ou anti B.

Nous avons pu le constater au cours de la sensibilisation de la suspension globulaire : quand le sérum hémolytique provient de cobayes préparés avec des hématies A ou B, il y a une agglutination très nette, si les hématies à sensibiliser sont du groupe A ou B.

Cette agglutination ne se produit pas quand on détermine l'index hémolytique de ce même sérum *frais* par rapport aux mêmes hématies.

C'est là une manifestation du rôle protecteur de l'alexine dont nous avons parlé précédemment.

2° Variation du pouvoir hémolytique :

a) *Le facteur alimentaire* a une grande importance sur la production des hémolysines. Nos animaux sont nourris essentiellement de pâtée de son de blé et de verdure (fanés de carotte, salade...).

DIACONO H. (28) a montré que les animaux (cobaye anti-mouton) dont la ration alimentaire comportait de l'orge, donnaient un sérum faiblement hémolytique.

b) *le facteur saisonnier* intervient dans la richesse des sérums hémolytiques. En effet, nous avons pu constater, aussi bien chez les cobayes anti-mouton que chez des cobayes anti-homme une baisse du titre hémolytique dans la période novembre-février, la ration alimentaire demeurant la même en hiver.

Dans une récente note, RICE C. E. et BOULANGER (106) indiquent qu'ils ont constaté une chute de complément en hiver et au début du printemps.

c) *la répétition des ponctions cardiaques* semble avoir aussi une influence sur le titre hémolytique, en dehors des plastrons osseux qui se forment dans les intervalles intercostaux. On constate que des animaux soumis à des ponctions répétées, donnaient des sérums de titre faible, mais que, après repos de deux semaines environ, le sérum hémolytique devenait bon.

3° Influence du titre hémolytique :

Nous avons vu précédemment que, dans la réaction d'hémolyse, hémolysine et complément étaient liés par une loi de suppléance.

Nous avons effectué de nombreux essais sur l'influence du titre hémolytique avant de nous arrêter à cette unité hémolytique de sensibilisation qui nous est donnée par l'index hémolytique du sérum frais.

a) *Titrage du sérum hémolytique selon la méthode classique :*

Parallèlement à la détermination de l'index hémolytique, nous avons titré le pouvoir hémolytique du sérum de cobaye chauffé,

selon les méthodes classiques : des doses croissantes de sérum hémolytique sont ajoutées dans un système comprenant des doses fixes de globules rouges et d'alexine humaine (mélange de sérum humain frais).

Le protocole opératoire est indiqué dans le tableau qui suit.

TABLEAU 18

Sérum hémolytique 1/10 ^e chauffé..	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80
Eau physiologique.....	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20
Sérum humain 1/10 ^e	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Globules rouges 2 %.....	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
1/2 heure à 37°								

La dose de sérum qui produit l'hémolyse totale est prise comme unité hémolytique.

Les essais effectués nous ont permis de constater que les résultats étaient semblables à ceux donnés par l'index hémolytique (déterminé sur le sérum frais).

L'unité hémolytique, ainsi déterminée, varie selon la quantité d'alexine.

Opérant dans les mêmes conditions de concentrations que précédemment (tableau 18), nous avons pu vérifier que ce titre variait selon la dose de complément en présence.

L'hémolyse totale est obtenue d'après le schéma suivant :

Unité hémolytique (Sérum hémolytique au 1/10 ^e)	Alexine (sérum humain au 1/10 ^e)
0,50 cm ³	0,20 cm ³
0,30 »	0,40 »
0,30 »	1.00 »

b) Essais sur la loi de suppléance :

Nous rapportons ici une série d'expériences, en distinguant celles

qui concernent la détermination de l'alexinémie en unités d'hémolyse totale, et celles qui concernent l'expression d'une unité d'hémolyse à 50 %.

Sous le nom d'unité hémolytique, nous entendrons la quantité de sérum hémolytique déterminée par l'index hémolytique (sérum frais, tableau 13) qui d'ordinaire se trouve identique à celle donnée par le titrage du pouvoir hémolytique (sérum chauffé, v. tableau 18).

— Les anti-sérums dont le titre est faible, doivent être rejetés : quand l'unité hémolytique dépasse 0,06 cm³ de sérum, la quantité d'hémolysine est trop faible et la réaction d'hémolyse perd sa sensibilité.

— Nous avons cherché à voir si un excès de sérum hémolytique influençait le titre du complément en unités d'hémolyse totale dans les conditions où nous opérons.

Plusieurs sérums ont été titrés, en sensibilisant les hématies avec 1 ou 2 unités hémolytiques, sous le volume de 0,40 cm³ pour 0,60 cm³ de suspension globulaire.

Les résultats sont groupés ci-dessous.

Sérum hémolytique, cm ³	Alexinémie (unités d'hémolyse totale)	
	0,04	0,08
Sérums humains 1.....	33,3	33,3
— 2.....	25	25
— 3.....	25	25
— 4.....	33,3	33,3

On constate que le titre ne varie pas.

— Quand le complément est titré en unités d'hémolyse 50 %, les variations de la concentration en hémolysines influencent nettement l'unité 50 %.

C'est ainsi que nous avons pu constater qu'en sensibilisant les hématies avec 1, 2, 3, ou 4 unités hémolytiques, la valeur de l'unité d'hémolyse 50 % varie en raison inverse.

Les résultats de nos essais sont rapportées dans le tableau suivant.

Alexinémie (unités 50 %)				
Sérum hémolytique.....	1 unité	2 unités	3 unités	4 unités
Sérum humain 1.....	117	285		
— 2.....	285	833	1250	
— 3.....	444		1428	1666
— 4.....	555	760		

Comme nous l'avons précédemment indiqué, nous ne recherchons pas la dose minima active de complément susceptible d'exercer son activité en présence d'un excès d'hémolysines.

D'autre part, au cours de ces essais, nous avons pu remarquer que, lorsqu'on opère en présence d'un excès d'hémolysines, l'allure de la courbe d'hémolyse est modifiée; la courbe perd sa forme en S, la pente devient plus grande et nous nous éloignons de la courbe de Von Krogh, comme l'indique l'exemple suivant (figure 7).

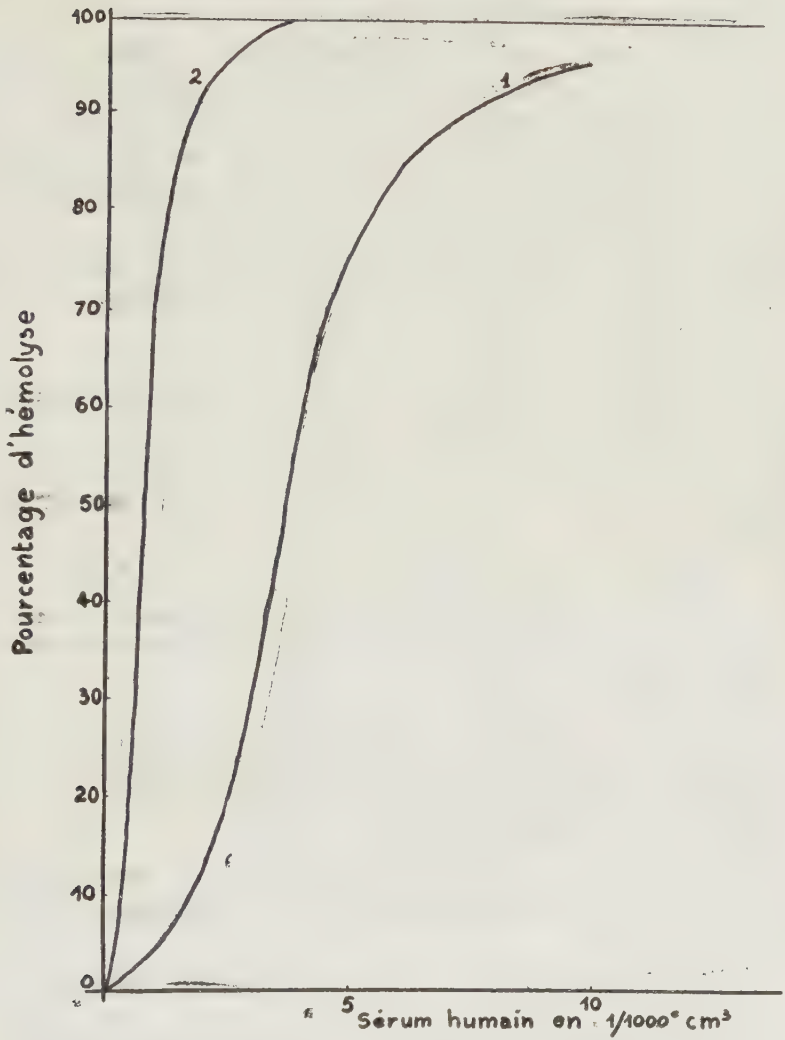
Température d'incubation.

Connaissant la fragilité du complément, il est certain que ce facteur est très important. La température optima de réaction est celle de 37°.

D'après MAYER (80) la valeur de l'unité 50 % varie avec la température, dans les limites suivantes :

Température	39	38	37	35,3	32,4
Titre après 45 mn	133	139	144	147	147

FIGURE 7



1. Courbe normale. — 2. Courbe modifiée.

Durée d'incubation.

A 37°, dans les conditions de concentration définie, l'hémolyse est pratiquement terminée en 30 à 45 min.

Quand on prend comme terme de la réaction, l'hémolyse complète, on peut remarquer qu'au bout d'un quart d'heure, la réaction

est pratiquement terminée. Les résultats sont lus d'une façon définitive après une demi-heure.

Cependant, quand on détermine l'unité 50 %, le sérum humain étant beaucoup plus dilué, la réaction est moins rapide. Nous avons pu vérifier une légère différence dans la valeur de l'unité 50 % d'un complément titré après une demi-heure et après trois-quart d'heure. Cette différence n'excède pas 15 % et nous avons fixé définitivement un temps d'une demi-heure dans notre protocole.

Durant le séjour au bain-marie, les tubes doivent être agités toutes les dix minutes, pour éviter la sédimentation des globules.

Concentration saline.

Nous empruntons les chiffres suivants à MAYER (80) concernant l'effet de la concentration saline.

Molarité.....	0,145	0,151	0,155	0,162	0,168	0,173	0,179
(NaCl et tampon)							
Titre.....	143	126	118	96	83	75	64

(tampon au véronal, pH 7,4)

Effet du pH.

En opérant à un pH voisin de la neutralité (pH 6,9 à 7,6), les variations de l'unité d'hémolyse à 50 % sont minimes.

Ordre de distribution des réactifs.

Il est important que les réactifs soient introduits dans les tubes dans l'ordre indiqué : sérum à examiner, eau physiologique, globules rouges sensibilisés.

La suspension globulaire doit toujours être ajoutée en dernier lieu.

Concentration finale.

Nous nous sommes arrêtés à une concentration finale de 2 cm³, après un premier essai de 1 cm³.

Comme on peut le constater dans le tableau 19, la réaction est plus rapide (moyenne de 0,0426 cm³ de sérum pur au lieu de 0,049).

Nous avons compensé ceci par l'addition de magnésium qui est activant (la moyenne remonte à 0,0395).

La lecture des résultats est plus facile sur 2 cm³.

TABLEAU 19

Résultats du dosage de 50 sérums humains normaux
(volume total 1 cm³)

0,04 cm ³	0,04 cm ³	0,07	0,04
0,05	0,06	0,03	0,05
0,04	0,05	0,04	0,05
0,06	0,03	0,03	0,03
0,06	0,05	0,03	0,03
0,04	0,04	0,04	0,04
0,06	0,03	0,06	0,03
0,03	0,04	0,05	0,04
0,05	0,03	0,04	0,04
0,03	0,05	0,04	0,05
0,07	0,03	0,05	0,05
0,03	0,03	0,04	0,05
0,03	0,04		

moyenne = 0,0426

Résultats du dosage de 11 sérums humains normaux
(volume total de 2 cm³)

0,05	0,04
0,05	0,07
0,04	0,05
0,06	0,05
0,03	0,06
0,04	

moyenne = 0.049

Résultats du dosage de 41 sérums humains normaux
(volume total de 2 cm³ avec addition d'ions Mg)

				0,04
0,03	0,03	0,04	0,05	0,03
0,03	0,04	0,05	0,04	0,03
0,03	0,05	0,05	0,04	0,04
0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
0,04	0,04	0,05	0,06	0,05
0,04	0,04	0,02	0,03	0,05
0,04	0,04	0,04	0,06	0,03
0,04	0,05	0,04	0,04	0,02

moyenne = 0,0395

TROISIEME PARTIE

LES VARIATIONS PATHOLOGIQUES DE L'ALEXINEMIE

A première vue, en raison du rôle de l'alexine dans les phénomènes humoraux, il semble que le titre alexique du sérum devrait nous donner une idée de l'état de défense de l'organisme.

Les auteurs ont cherché à voir, si, dans une maladie donnée, le titre alexique pouvait constituer un indice de l'évolution et apporter ainsi un intérêt pronostique.

D'autre part, on s'est demandé si on pouvait caractériser des maladies hyperalexiques et des maladies hypoalexiques. Le titre alexique serait alors intéressant pour appuyer le diagnostic.

Si nous nous référons aux auteurs que nous avons consultés, MEERSSEMAN, RANQUE, VARGUES et KOURILSKY en France, SCARTOZZI en Italie et ECKER aux Etats-Unis, les conclusions de ces différents chercheurs se rejoignent : la connaissance du titre alexique du sérum ne peut apporter un élément absolu de pronostic ou de diagnostic.

Les résultats des divers travaux, sur la même affection, ne sont pas toujours concordants ; c'est ainsi que, dans la *tuberculose pulmonaire*, SCARTOZZI observe un taux élevé de l'alexinémie dans les formes évolutives, et un taux à peu près normal dans les formes peu évolutives. D'autres auteurs ne constatent pas de variations notables du pouvoir alexique dans cette affection.

Au sujet du *paludisme*, toutefois, il est unanimement admis que l'alexinémie subit une chute au moment de l'accès palustre et revient à la normale par la suite.

Dans les affections hépatiques, de même, les auteurs rapportent une hypoalexinémie, dans les cas où la cellule hépatique est atteinte.

Peut-être faut-il chercher la raison des divergences observées dans le type de technique employée. Dans les travaux anciens, en particulier, le pouvoir alexique est souvent apprécié par le pouvoir hémolytique total du sérum vis-à-vis des globules rouges de mouton sans

tenir compte du pouvoir hémolytique naturel, qui, dans certains cas pathologiques justement, subit un accroissement.

D'autre part, comme le fait remarquer VARGUES, généralement « les auteurs constatent l'augmentation ou la diminution du pouvoir alexique global, sans rechercher sur quel composant porte principalement la déficience ».

Il semble bien que la connaissance même du problème de l'alexine demande à être approfondie, avant de pouvoir accorder une signification clinique aux variations de l'alexinémie.

Nous nous proposons de rapporter ici les résultats de quelques observations, que nous avons obtenues en expérimentant la technique de détermination de l'alexinémie précédemment décrite.

Nous envisagerons successivement :

1° L'alexinémie dans la *tuberculose*;

2° L'alexinémie dans les maladies à protozoaires, en particulier dans le *paludisme*;

3° L'alexinémie dans les maladies à virus, en particulier dans le *trachome*;

4° L'alexinémie dans les *affections hépatiques*;

5° L'alexinémie dans les *états anaphylactiques*;

6° L'alexinémie et la protidémie.

1° L'ALEXINÉMIE DANS LA TUBERCULOSE

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'alexinémie au cours de la tuberculose; les résultats publiés sont souvent contradictoires.

C'est ainsi que GOUSSEV (51) constate une élévation parfois considérable du taux alexique. Mais cette augmentation fait défaut dans les cas à issue fatale.

GAUDEAU (44) observe, au contraire, une diminution du titre alexique.

HANSSON (52) ne trouve pas de modification.

Parmi les travaux plus récents, nous citerons l'étude systématique de l'alexinémie au cours de la tuberculose par SCARTOZZI (117). L'auteur pense que dans la tuberculose pulmonaire, le pouvoir complémentaire est susceptible de varier du fait des modifications de l'équilibre protéique du sérum au cours de l'infection.

Chez les 295 malades examinés, on détermine en même temps l'alexinémie et la vitesse de sédimentation.

Les résultats obtenus sont les suivants :

— Dans les formes cliniques graves, évolutives, à vitesse de sédimentation élevée, le pouvoir complémentaire est supérieur à la normale.

— Dans les formes cliniques de gravité moyenne, à vitesse de sédimentation peu ou pas augmenté, avec tendance à la stabilisation, le pouvoir complémentaire est voisin de la normale.

Il y a donc un parallélisme évident entre pouvoir complémentaire, vitesse de sédimentation et état de la maladie.

L'auteur conclut donc que le dosage du complément peut donner un indice « plus que de la gravité de la maladie au moment de l'analyse, de la tendance à évoluer, de la maladie elle-même ».

D'après les résultats de 13 observations de tuberculeux, MEERSSEMAN (83) trouve également que les variations de l'alexinémie peuvent présenter un intérêt pronostique.

VARGUES (127) ne signale pas de variations du taux alexique dans les cas observés.

De même, on trouve dans un travail de KOURILSKY et Madame DRILHON-CORRE (68) un examen de plusieurs cas de tuberculose pulmonaire, distinguant les lésions très évolutives des lésions peu évolutives. Les auteurs concluent qu'« aucune indication sur la modalité évolutive de l'affection ne saurait être tirée des chiffres obtenus, puisque, si, dans certains cas, cette évolution semble se faire parallèlement aux variations du pouvoir alexique, elle est, chez d'autres malades, d'une contradiction déconcertante ».

Nous indiquons, ci-dessous, les résultats de quelques observations. Les sérums nous ont été fournis par le Service de Phthisiologie de l'Hôpital militaire Louis Vaillard, de Tunis.

- OBSERVATION 1. — M. Le B... Convalescent de pleurésie, traité par la streptomycine.
Alexinémie: 25 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 2. — M. S... Cavitaire avancé, en traitement depuis un an.
Alexinémie: 25 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 3. — M. G... Adénopathie hilare gauche avec cuti ++. Température subfébrile. Réactivation ganglionnaire probable. Traité au P.A.S. depuis 3 jours.
Alexinémie: 16,6 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 4. — M. H... Infiltration tuberculeuse droite excavée (malade depuis 1948).
Alexinémie: 25 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 5. — M. L... Infiltration excavée droite. Création récente de pneumothorax.
Alexinémie: 20 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 6. — M. A... Infiltration excavée gauche. Création récente de pneumothorax.
Alexinémie: 25 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 7. — M. B... ben S. Tuberculose bilatérale traitée au P.A.S. Amélioration de l'état général, apyrétique, nettoyage des images radiologiques.
Alexinémie: 25 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 8. — M. S... ben B. Primo-infection tuberculeuse.
Alexinémie: 20 unités (hémolyse totale).
- OBSERVATION 9. — Mme L. Miliare, traitée par la streptomycine.
Alexinémie: 20 unités (hémolyse totale).

Nous pouvons constater que l'alexinémie des sérums tuberculeux examinés se montre normale. Seul, le sérum 3 présente un taux diminué.

Les cas personnellement observés sont trop peu nombreux pour que nous puissions tirer une conclusion d'ordre général sur les variations de l'alexinémie au cours de la tuberculose.

2° L'ALEXINÉMIE DANS LES MALADIES A PROTOZOAIRES

a) PALUDISME.

Depuis les travaux de CATHOIRE et VINCENT (21), il est bien connu que l'alexine subit une chute, au moment de l'accès palustre.

Cette baisse du titre alexique a été observée, également par MEERS-SEMAN (83). L'auteur note que « la baisse est importante au moment de l'accès et peut persister pendant un certain temps, et serait fonction de la répétition des paroxysmes. ».

Le travail le plus approfondi est certainement celui qui a été effectué par VARGUES (127) et ZERMATI (133, 134) grâce à l'observation de 120 malades de la clinique des maladies infectieuses d'El Kettar (Alger).

Le titre alexique du sérum a été étudié en tenant compte du stade clinique de l'infestation, de l'espèce d'hématozoaire et de l'intensité de l'infestation du sang périphérique.

a) Alexine et stade clinique :

— Dans les cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* (les plus fréquents en Algérie), dans les premiers jours de la maladie, le taux de l'alexine est normal, puis il diminue graduellement à partir du 10^e jour, pour atteindre des chiffres bas, fréquemment nuls. On n'a pas pu suivre l'évolution de l'alexinémie car les malades ont été traités.

— Dans la fièvre tierce bénigne à *Plasmodium vivax*, l'aspect de la courbe alexique est différente selon que le malade est en phase de primo-invasion ou en période de rechute.

Lors des primo-invasions, le taux augmente légèrement puis diminue. L'arrêt spontané de l'infection ramène le taux au chiffre primitif.

Au cours des accès de rechute, la courbe alexique est inversement proportionnelle à celle de la température : à mesure que s'élève la température, le chiffre alexique décroît, atteint un minimum et remonte quand la température redescend.

— Deux cas seulement de *Plasmodium malariae* ont pu être étudiés : le titre est légèrement abaissé dans l'un, nul dans l'autre.

— Chez les malades en état de prémunition, l'alexinémie est normale.

— Au cours des comas pernicioeux à *Plasmodium falciparum*, dans les cas graves, le taux alexique se maintient nul ou décroît jusqu'à la mort.

Dans les cas à évolution favorable, le taux s'élève régulièrement jusqu'à guérison.

b) alexine et espèce de *plasmodium* infestant :

L'infection à *Plasmodium falciparum* est fortement hypoalexique et fréquemment analexique, tandis que, en général, la fièvre à *Plasmodium vivax* n'entraîne qu'une baisse relative de l'alexine.

c) alexine et intensité de l'infestation du sang périphérique :

Il y a un rapport certain entre le nombre de parasites du sang périphérique et la concentration alexique.

On peut dire qu'une infestation massive s'accompagne d'une importante baisse, alors qu'une infection à rares hématozoaires correspond à un chiffre à peu près normal.

De même, l'abaissement alexique au moment de la libération des schizontes de l'accès tierce, est une preuve de ce parallélisme.

L'hypoalexie du paludisme pourrait s'expliquer, selon VARGUES, soit par un trouble de l'alexigénèse, soit par une fixation sur un complexe antigène-anticorps, *in vivo*, en particulier, au moment de l'éclatement des corps en rosace.

Récemment, VARGUES, FABIANI et FULCHIRON (129) ont étudié l'infection expérimentale du rat blanc par *Plasmodium berghei*. Ces auteurs ont pu constater que ce *Plasmodium* se comportait comme un antigène et provoquait la formation d'anticorps spécifiques.

Durant la maladie, l'alexinémie varie en sens inverse de l'infestation sanguine et peut être nulle quand l'infestation est massive. Le taux alexique redevient normal, quand l'infection évolue vers la guérison.

Au contraire, au moment de la mort, le taux alexique est nul. Ces constatations sont semblables à celles observées au cours du paludisme humain.

Personnellement, nous avons pu examiner deux échantillons de sang de paludéens, prélevés au moment de l'accès palustre.

OBSERVATION 1. — M. X... Le taux alexique est très abaissé : 8,3 unités (100 %) et 50 unités (50 %).

OBSERVATION 2. — M. V... Parasité par *Plasmodium vivax* depuis longtemps, le malade est sujet à des accès mensuels. Au cours d'un de ceux-ci, on peut constater une alexinémie très diminuée : 5 unités (100 %).

Le malade est traité à la nivaquine (0,60 g. pendant 5 jours puis 0,60 g. 2 fois par semaine). Quinze jours après, un nouvel examen permet de constater que le taux alexique a augmenté et se rapproche de la normale : il est, en effet, de 16,6 unités (100 %).

b) AMIBIASE.

La dysenterie amibienne ne semble pas déterminer de variations du taux alexique.

VARGUES cite quatre cas, à titre alexique normal.

Nous avons eu à examiner un cas de dysenterie amibienne aiguë, avec température élevée.

Avant le traitement, l'alexinémie s'est montrée normale : 25 unités (100 %).

Dix jours après, la température est toujours élevée, malgré le traitement : le titre alexique reste normal.

c) TRYPANOSOMIASE.

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des variations alexiques au cours de la maladie du sommeil.

VARGUES rapporte des travaux relativement anciens. C'est ainsi que SICÉ (119), au cours d'études sur les modifications sérologiques dans la maladie du sommeil, a établi que le sérum de sommeilleux a un titre alexique très faible, ordinairement nul dans les périodes d'évolution nerveuse.

d) FIÈVRE RÉCURRENTE.

Les seules observations concernant les variations de l'alexine au

cours de cette maladie ont été signalées par VARGUES. Il semble qu'il y ait une analogie avec le paludisme : au cours des périodes fébriles, quand les spirochètes abondent dans le sang, le taux alexique est diminué.

3° ALEXINÉMIE ET MALADIES A VIRUS

Dans la *variole*, Thompson (125) note une diminution du complément au stade primitif, avec un rapide retour à la normale des cas non suivis d'infections secondaires.

VARGUES (127) cite quatre observations de variole, avec un taux alexique un peu augmenté.

Dans la *varicelle*, ECKER et ses collaborateurs (38) trouvent un taux normal dans cinq cas, et un taux légèrement diminué dans un 6^e cas.

Au cours d'*oreillons* simples ou compliqués de phénomènes méningés ou orchitiques, RANQUE (104) ne signale aucune variation du titre alexique.

Dans la *fièvre jaune*, DA COSTA CRUZ (22) a pu établir que l'abaissement du titre du complément était significatif pour le diagnostic. Sur 103 cas examinés, 93,6 % présentent une diminution du titre alexique, d'autant plus importante que la maladie est plus grave.

C'est surtout la fraction albuminique qui fait défaut.

A la convalescence, l'alexine reparait rapidement dans le sérum.

Trachome.

Nous n'avons trouvé dans la littérature, aucune publication concernant ce sujet.

Personnellement, au cours de la campagne menée par l'Organisation Mondiale de la Santé contre ce fléau de nos régions qu'est le trachome, nous avons pu examiner six sérums de trachomateux, à plusieurs stades de l'évolution de la maladie.

Nous n'avons noté aucune variation du pouvoir alexique.

4° L'ALEXINÉMIE DANS LES AFFECTIONS HÉPATIQUES

Si l'on parcourt la littérature consacrée à l'étude des variations de l'alexinémie dans les affections hépatiques les plus diverses, on peut remarquer que les auteurs sont unanimes à constater une baisse du pouvoir alexique.

Cette déficience alexique apparaît d'autant plus importante que le tissu hépatique est plus lésé.

C'est ainsi que MEERSSEMAN (83) conclut, d'après plusieurs observations de cirrhoses, ictères et syndrômes d'insuffisance hépatique, à une baisse notable du pouvoir alexique, « même dans des atteintes peu profondes de l'organe telles que celle qui caractérise l'ictère dit catarrhal. ».

RANQUE (104) également, note une diminution dans l'ictère catarrhal et dans des cirrhoses.

Dans deux cas de cholécystites subaiguës, dont une lithiasique, l'auteur ne trouve aucune modification de l'activité complémentaire.

De même, VARGUES (127) arrive aux mêmes conclusions : chute alexique dans les cirrhoses atrophiques, mais valeurs normales dans les affections des voies biliaires sans atteinte parenchymateuse.

Un élément nouveau et intéressant sur ce chapitre est apporté par une étude systématique menée par JORDAN (61) sur 52 malades.

L'auteur a remarqué que, si le titre complémentaire est bas dans les cirrhoses hépatiques, il est au contraire très élevé dans les ictères par obstruction. On peut alors se demander si l'alexinémie peut avoir la valeur d'un test dans le diagnostic différentiel des cirrhoses, des hépatites et des ictères par obstruction.

L'étude entreprise par JORDAN a compris la détermination de l'alexinémie, parallèlement aux réactions de GROS, MAC LAGAN et à la phosphatasémie alcaline.

Les résultats des essais permettent de conclure que :

— « la détermination du complément donne de plus grandes différences par rapport à la normale que les autres tests hépatiques, et

que sa valeur comme moyen de diagnostic est donc supérieure au point de vue de la statistique. »

— le taux du complément est normal dans l'hépatite, abaissé dans la cirrhose et élevé dans l'ictère par obstruction.

Personnellement, nous avons examiné trois cas intéressants et dont les résultats rejoignent ceux de JORDAN.

OBSERVATION 1. — *Cirrhose hépatique* chez un sujet splénectomisé.

Les réactions de Gros et de Mac Lagan sont positives; l'icterus index est de 40 unités.

L'alexinémie est *très diminuée*: 12,5 unités (hémolyse totale).

Un autre sujet splénectomisé mais ne présentant pas d'atteinte du foie, possède un taux alexinique normal de 20 unités.

OBSERVATION 2. — *Ictère par rétention* avec hépatite secondaire.

La réaction de Gros est positive, la réaction de Mac Lagan normale.

Le sérum se révèle *hyperalexique*: 1.000 unités 50 %.

OBSERVATION 3. — Dans ce cas, le diagnostic n'a pas été posé de façon définitive.

Il s'agissait vraisemblablement d'une hépatonéphrite grave.

Le sujet était sérieusement atteint et est décédé trois semaines après son hospitalisation.

Deux examens à huit jours d'intervalle ont indiqué une *hyperalexinémie*: 50 unités hémolyse totale).

5° L'ALEXINÉMIE DANS LES ÉTATS ANAPHYLACTIQUES

Expérimentalement, il est bien établi que le choc anaphylactique chez le cobaye, est accompagné, à côté d'autres modifications du milieu sérique, d'une chute nette de l'alexine.

De même, en clinique, les auteurs sont unanimes à reconnaître que l'activité alexique est considérablement diminuée dans les états anaphylactiques, particulièrement à la période aigüe du choc.

MEERSSEMAN (83) cite quelques observations. En particulier, dans deux réactions sériques, avec urticaire et, pour l'une d'elles, œdème de la glotte, le pouvoir alexique est très abaissé. Mais, après disparition des accidents, ce pouvoir redevient normal.

RANQUE (104) indique également une baisse importante de l'alexinémie au cours de réactions sériques, d'une réaction d'intolérance au sulfarsénol et d'une crise d'œdème de Quincke.

L'auteur fait remarquer, avec justesse, qu'il y a lieu de distinguer les états anaphylactiques chroniques, tels que certains eczémas et certaines dermo-épidermites professionnelles, donnant lieu à des modifications peu importantes du titre alexique.

Nous avons eu l'occasion de prendre connaissance d'un travail de BEGEY (8) sur les variations du pouvoir complémentaire dans certaines dermatoses. L'auteur constate une diminution de ce pouvoir dans les affections de la peau (particulièrement l'urticaire) apparentées à un état allergique.

Tous ces faits, expérimentaux et cliniques, permettent donc de constater une perte du complément au moment du choc anaphylactique. On a pu se demander si cet épuisement alexique représentait une conséquence du choc anaphylactique, ou bien constituait une cause même du choc.

Cette dernière conception semble prévaloir.

Il est probable que l'alexine se fixe, *in vivo*, sur le complexe antigène-anticorps, formé au moment du choc.

STAVITSKY (121) et ses collaborateurs apportent un appui à cette hypothèse par une étude expérimentale.

Ces auteurs ont constaté que le complément disparaît 30 à 60 minutes après la réinjection d'un antigène, au lapin, par suite de sa fixation sur le complexe antigène-anticorps formé *in vivo*.

Déjà, en 1915, BESSEMANS (12) pensait que la perte du complément se faisait aux dépens du chaînon intermédiaire, le chaînon terminal ne subissant qu'une modification insignifiante.

Cette même idée est soutenue par HECHT (54) qui écrit « on sait que la perte de complément par un choc anaphylactique peut être empêchée par l'injection préventive d'une solution hypertonique de chlorure de sodium. Puisqu'une haute concentration en chlorure de sodium ne préserve pas le chaînon terminal, on peut supposer que l'effet destructeur d'un choc anaphylactique est causé par l'inactivation de la fonction du chaînon intermédiaire. ».

Il est à noter que l'héparine qui se comporte comme une substance anticomplémentaire possède également un effet anti-anaphylactique.

Concernant toujours les rapports de l'alexine et de l'anaphylaxie, nous signalerons une série de travaux de ZACCO (136, 137) qui tendent à montrer un parallélisme entre le pouvoir complémentaire et la teneur en histamine du sérum. Or, on sait que, pour certains auteurs, l'histamine serait responsable des accidents anaphylactiques.

6° ALEXINÉMIE ET PROTIDÉMIE

Dans leur travail sur le complément dans les maladies infectieuses, ECKER et ses collaborateurs (38) se sont préoccupés de voir s'il existait un rapport entre le titre du complément et la teneur en protéines du sérum.

D'après l'observation de 190 sérums de concentrations en protéines diverses, il semble bien que la concentration des protéines influence la teneur en complément.

Un sérum possédant un faible taux de protides a tendance à avoir un titre alexique bas, tandis qu'un sérum contenant beaucoup de protéines tend à posséder un titre alexique élevé.

VARGUES (127) également a pu constater qu'au cours du paludisme, titre alexique et protidémie variaient parallèlement.

Dans l'accès à *Plasmodium vivax*, les protides comme l'alexine suivent une courbe inverse de celle de la température.

De même, l'amélioration des malades est marquée par une courbe alexique ascendante parallèle à la courbe de la protidémie.

Par contre, dans les maladies infectieuses (pneumonie, fièvre ty-

phoïde, méningite...) dans lesquelles on ne constate pas de variations notables de la protidémie, on n'observe pas non plus d'hypoalexie.

Cependant, VARGUES précise qu'il n'est pas aussi catégorique que ECKER.

Nous citerons l'étude expérimentale entreprise par RICE (108) sur ce même sujet.

Des cobayes sont soumis à un régime alimentaire dont le contenu en protéines est suffisamment réduit pour entraîner une perte considérable de poids. On constate alors, parallèlement à l'abaissement de la protidémie, une diminution du titre du complément et un allongement du temps de coagulation.

Il est probable que d'autres facteurs, non déterminés, interviennent dans ce parallélisme car l'alexine ne représente malgré tout qu'une faible partie des protéines totales du sérum.

QUATRIEME PARTIE

ESSAIS EXPERIMENTAUX

A. — ESSAIS SUR L'ACTION DE L'HEPARINE

L'action anticoagulante de l'héparine est connue depuis longtemps, sans que l'on sache exactement par quel mécanisme cette substance agit.

Il demeure cependant qu'elle s'oppose à la transformation de la prothrombine, d'une part, à l'action de la thrombine sur le fibrinogène d'autre part, et même à la libération de la thromboplastine par les plaquettes.

Dans un travail récent de DONZELOT et KAUFMANN (33), l'action anticoagulante est présentée comme un aspect de l'action de l'héparine sur le milieu sanguin, action que les auteurs qualifient de « dispersion ».

Cet effet disperseur se traduit par des modifications profondes de l'équilibre protidique avec modification des courbes d'électrophorèse et d'ultracentrifugation. De même, l'héparine agit contre le « sludging », tendance des éléments cellulaires à se ramasser en masses irrégulières.

Du fait des rapports entre coagulation et activité complémentaire, les auteurs ont étudié l'action de l'héparine sur le complément.

In vitro, les auteurs ECKER (40), PECK et THOMAS (99) s'accordent pour constater un effet anticomplémentaire.

In vivo, les résultats sont contradictoires, comme le relate LI VOTI (75) : pour ECKER, l'héparine est anticomplémentaire ; mais elle ne l'est pas, selon FUCHS (43).

A notre tour, nous avons entrepris quelques essais préliminaires d'un travail plus précis sur le problème des rapports entre coagulation et activité complémentaire, travail que nous nous proposons d'effectuer par la suite.

ACTION DE L'HÉPARINE IN VITRO

a) SUR LE SÉRUM :

1° Alexinémie d'un sérum humain.

Nous titrons l'alexine d'un sérum humain selon la technique que nous avons décrite. Ce sérum possède un titre de 50 unités (hémolyse totale).

2° Alexinémie du même sérum en présence d'héparine.

L'héparine employée est de la Liquémine Roche, diluée au 1/100° avec de l'eau physiologique. Un cm³ de cette dilution renferme 50 U. I. d'héparine.

L'héparine est ajoutée, à doses croissantes, dans trois tubes contenant la quantité de sérum humain, déterminée dans le premier titrage.

Sérum humain au 1/10°.....	0,2	0,2	0,2
Eau physiologique	0,6	0,4	0,2
Héparine au 1/100°	0,2	0,4	0,6
Globules rouges sensibilisés	1	1	1
une demi-heure à 37°			
Résultats	H	Hp	0

On constate une inhibition partielle de l'hémolyse au 2° tube, soit pour 0,4 cm³ d'héparine au 1/100° = 20 U. I. (dose limite d'inhibition).

Et une inhibition complète au 3° tube, soit pour 0,6 cm³ d'héparine au 1/100° = 30 U. I.

3° Alexinémie du même sérum en unités d'hémolyse 50 %.

Le titrage est effectué avec les mêmes réactifs que précédemment.

Ce sérum titre 333 unités 50 %.

4° Alexinémie en présence d'héparine.

Le titrage est effectué en présence de la dose inhibitrice de 20 U. I. d'héparine.

On constate un retard dans l'hémolyse, le point d'hémolyse à 50 % étant obtenu seulement pour 0,0096 cm³ de sérum, ce qui donne un titre de 104 unités 50 %, au lieu de 333.

b) SUR LE PLASMA :

Nous avons vérifié l'action anticomplémentaire de l'héparine sur le plasma.

Les essais sont conduits de la même manière que pour le sérum.

L'héparine est inhibitrice à la même dose.

En bref, nous avons constaté l'effet anticomplémentaire déjà démontré de l'héparine.

Le fait que cette action se manifeste aussi bien sur le plasma que sur le sérum ne nous paraît pas en faveur d'un parallélisme complément-prothrombine.

En effet, d'après les conceptions les plus récentes [OWREN (97), KOLLER (65)], la prothrombine est consommée dans la coagulation et on n'en trouve plus dans le sérum. Ce qui reste dans le sérum est un des facteurs de la conversion, la proconvertine ou facteur VII.

Ce point de vue dirige nos recherches dans le sens non pas d'un parallélisme prothrombine-complément, mais d'activateurs communs des deux phénomènes, coagulation et hémolyse.

ACTION DE L'HÉPARINE IN VIVO

On choisit cinq cobayes mâles (n^{os} 13, 14, 15, 16, 17), d'un poids moyen de 600 grammes.

Avant le début du traitement, on procède pour chacun à :

— un titrage de l'alexine suivant notre technique.

— la détermination du temps de coagulation par la méthode de DE HAYEM.

Traitement à l'héparine.

Nous commençons par injecter des doses faibles d'héparine pour tâter la susceptibilité des animaux.

Pendant les quatre premiers jours, on injecte dans le péritoine 0,5 cm³ de Liquémine Roche diluée au 1/10^e.

Le cinquième jour, on injecte 0,5 cm³ de Liquémine diluée au demi, puis on fait deux injections de 0,5 cm³ de Liquémine pure.

Ceci représente une administration totale de 8.000 U. I. d'héparine.

Le lendemain, 3 cobayes 14, 15 et 17 présentent un état de nette cachexie. Il est à remarquer que ce sont les cobayes les plus petits qui succombent les premiers.

Le cobaye 17 ne peut être ponctionné au cœur; on lui sectionne la carotide.

Son sang est incoagulable.

Le titre de l'alexine est déterminé sur le plasma que l'on sépare par centrifugation.

On trouve 66 unités d'hémolyse 50 %. L'alexinémie est donc très diminuée.

Ce chiffre nous paraît entâché d'une erreur du fait que le sang n'a pas été recueilli dans de bonnes conditions.

Le cobaye 15 subit une ponction cardiaque après laquelle il succombe.

Son sang est incoagulable.

Le titre alexique est de 121 unités 50 %, au lieu de 666 unités avant le traitement.

Nous observons donc une chute nette de l'alexinémie.

Le cobaye 14 n'est pas ponctionné. On le laisse au repos durant trois jours. Au bout de ce temps, il a repris un état apparemment normal. Il supporte bien une ponction cardiaque.

L'héparine fait encore son effet puisque le temps de coagulation est allongé: 2' 45" au lieu de 1' 20" avant le traitement.

Parallèlement, l'alexinémie est diminuée: 526 unités au lieu de 760.

Les cobayes 13 et 16 qui ont bien supporté les 8.000 U. I. d'héparine reçoivent encore 5.000 U. I.

Le cobaye 16 succombe à la ponction cardiaque.

Son sang est incoagulable.

L'alexinémie est diminuée : 212 unités au lieu de 416 unités avant le traitement.

Le cobaye 13 subit sans dommage une ponction cardiaque. Le temps de coagulation est allongé : 3' 30'' au lieu de 2' avant le traitement.

L'alexinémie est diminuée : 416 unités au lieu de 666 unités initialement.

On continue à injecter de l'héparine par 2.500 U. I. (0,5 cm³ de Liquémine) aux cobayes 13 et 14 qui survivent.

Le cobaye 14 subit une ponction cardiaque après avoir reçu 13.000 U. I. d'héparine.

Le temps de coagulation est considérablement allongé : 7' 20''.

Parallèlement, l'alexinémie diminue : 227 unités au lieu de 526 unités.

On lui injecte encore 2.500 U. I.

Le lendemain, son état général s'affaiblit et il succombe après une ponction cardiaque.

Son sang est incoagulable.

L'alexinémie est très diminuée : 138 unités au lieu de 760 unités avant le traitement.

Le cobaye 13 a résisté à 25.000 U. I. Nous n'avons pas pu le ponctionner avant qu'il meure.

Après l'injection de 18.000 U. I. d'héparine, il présentait un temps de coagulation très allongé : 9' 45'' et une alexine très diminuée : 263 unités au lieu de 666 unités avant le traitement.

Tous ces résultats sont condensés dans le tableau 20 (voir page 121).

*Essai de réactivation des sérums héparinés
à l'aide d'un sérum chauffé*

MUTSSAARS (92) indique dans une récente publication un travail de ECKER et CROSS selon lequel l'alexine inactivée par l'héparine, pouvait être réactivée par du sérum chauffé à 55° ou de l'alexine traitée par l'ammoniaque, mais pas par de l'alexine traitée par le venin de cobra.

Ce serait donc C'3 qui serait détruit ou bloqué par l'héparine. MUTSARS, reprenant ce travail, a constaté que l'alexine héparinée ne peut être réactivée par du sérum inactivé par chauffage, mais peut l'être par de l'alexine traitée par le venin de cobra et par l'ammoniaque.

Guidés par ces données, nous avons effectué un bref essai, en ajoutant du sérum de cobaye chauffé à des sérums de cobayes traités à l'héparine.

Nous n'avons constaté aucun effet réactivant, en accord avec MUTSARS.

CONCLUSIONS

Sous l'effet de doses importantes d'héparine, l'alexinémie s'est abaissée, parallèlement à l'allongement du temps de coagulation.

Suivant les cas, le titre alexique a diminué de 50 à 80 % de sa valeur initiale.

Nous constatons donc un effet inhibiteur de l'héparine sur le phénomène de la coagulation et sur l'activité complémentaire.

Ces essais trop brefs, ne nous permettent pas de conclure à une identité prothrombine-alexine, selon l'hypothèse de FUCHS. Ils ne peuvent qu'ouvrir une voie de recherches: l'héparine agit-elle sur un activateur commun au système de la coagulation et au pouvoir complémentaire, ou bien agit-elle spécifiquement sur l'alexine ou certains de ses composants ?

Nous remercions les Laboratoires ROCHE, représentés à Tunis par M. JARMON, de nous avoir fourni gracieusement de la Liquémine.

TABLEAU 20

Action de l'héparine sur l'alexinémie

Cobayes	15		17		16		14		13	
	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
Avant traitement	2' 30"	666	1' 15"	625	2'	416	1' 20"	760	2'	666
Héparine 8.000 U. I.	incoagu- lable	212	incoagu- lable	66	incoagu- lable	212	2' 45"	526	3' 30"	416
13.000 U. I.							7' 20"	227		
15.500 U. I.							incoagu- lable	138		
18.000 U. I.									9' 45"	263

C = temps de coagulation.

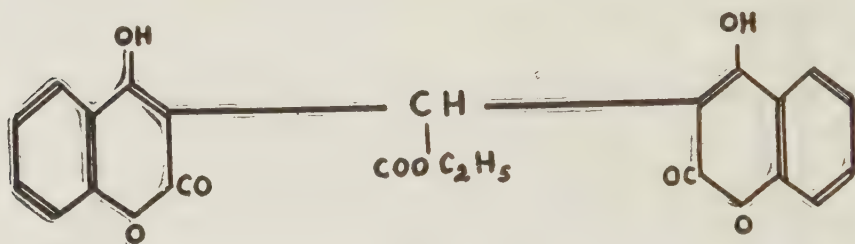
A = alexinémie unités 50 %.

B. — ESSAIS CONCERNANT L'ACTION DU TROMEXANE SUR L'ALEXINEMIE

C'est à la suite d'une observation intéressante d'un cas d'hypo-prothrombinémie, présentant un effondrement de l'alexine, que nous avons dirigé nos recherches sur l'action de ce nouvel anticoagulant, le tromexane, sur l'alexinémie.

On sait que le tromexane a une constitution voisine de celle du dicoumarol.

C'est en effet, l'esther éthylique de l'acide di—3,3' (4 — oxycoumarinyl) acétique.



Le tromexane présente sur le dicoumarol, l'avantage d'agir plus vite, — étant plus soluble —, et d'être plus vite éliminé.

Comme le dicoumarol, il se comporte comme une antivitamine K, et s'oppose à la synthèse hépatique de la prothrombine.

Mais, alors que, pour le dicoumarol, la réponse de l'organisme est décalée, c'est-à-dire que la chute de la prothrombinémie ne coïncide pas avec la concentration maxima de l'anticoagulant, après administration de tromexane, la prothrombine baisse rapidement.

Peut-être, comme le suggèrent LIAN et ses collaborateurs (72) auxquels nous empruntons ces renseignements, cet anticoagulant agit-il directement sur le phénomène de la coagulation.

Toujours guidés par l'idée d'un rapport possible entre les deux phénomènes : coagulation et pouvoir complémentaire, plusieurs travaux ont été entrepris sur l'effet du dicoumarol sur l'alexine.

Nous avons déjà signalé que MILLA et CASTEGNARO (87, 88), d'une part, RICE et BOULANGER (108) d'autre part, avaient constaté que,

chez des cobayes traités au dicoumarol, le temps de prothrombine était allongé, mais le pouvoir complémentaire ne variait pas.

LI VOTI et MUTOLO (75), au contraire, observent une baisse de l'activité complémentaire.

Avant de rapporter nos essais expérimentaux, nous citerons quelques observations d'hypoprothrombinémie chez l'homme.

OBSERVATIONS CLINIQUES

Nous avons eu l'occasion de déterminer l'alexinémie de sujets présentant une hypoprothrombinémie, relative à un traitement au tromexane.

Nous groupons nos observations sous forme de tableau pour mettre en évidence les résultats obtenus.

Observations	Traitement au tromexane	Test à l'héparine	Taux de prothrombine	Alexinémie u. 50 %
1	M. S..., Infarctus du myocarde. 3 comprimés de tromexane. Le sujet est en état d'hypocoagulabilité	23' (témoin 11')	25 %	11
	Dans la nuit, il fait des hémorragies. Le lendemain 24 h. après, après administration de vitamine K et transfusion sanguine		indosable	11
			23 %	68
2	M ^{me} D..., en traitement d'entretien au tromexane		16 %	25 (u. 100 %)
3	M. S..., après administration de 3 comprimés.		55 %	532
4	M. A..., traitement d'entretien		52 %	555
5	M ^{me} C..., traitement d'entretien		30 %	555
6	M. Ch..., traitement d'attaque depuis 4 jours 8 jours après, état d'hypocoagulabilité ..	16' 30'' 24'	45 % 17 %	666 356
7	M ^{me} B..., traitement d'entretien		7 %	300
8	M. G..., traitement d'entretien		26 %	333

Ainsi, sur les 8 cas qui ont été soumis à notre expérimentation :

— 3 (observations 2, 7, 8) présentent une alexinémie normale, coexistant avec un faible taux de prothrombine.

— 4 (observations 3, 4, 5, 6) présentent une hyperalexinémie. Mais dans le cas 6, l'alexinémie redevient normale, malgré une chute plus accentuée de la prothrombine et l'apparition d'hypocoagulabilité.

— dans la première observation seulement, on observe un effondrement de l'alexine, parallèlement à l'effondrement de tout le système de la coagulation (hypoprothrombinémie et hypocoagulabilité). Le malade se trouvait d'ailleurs à toute extrémité. Après la transfusion et le traitement à la vitamine K, on peut constater un relèvement rapide de l'alexinémie.

Il ne semble donc pas qu'il y ait une similitude entre prothrombine et alexine.

En nous basant sur ces résultats, nous avons entrepris une étude expérimentale chez des cobayes sains chez lesquels on institue un état d'hypocoagulabilité, à l'aide de tromexane, en vérifiant parallèlement les variations de l'alexinémie.

ESSAIS EXPÉRIMENTAUX

Matériel et méthodes.

On choisit neuf cobayes mâles (n^{os} 18, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 29, 30), d'un poids moyen de 500 g.

Avant d'entreprendre le traitement, on prélève sur chaque animal, à jeun, du sang par ponction cardiaque.

Un échantillon de sang est recueilli sur du mélange de Wintrobbe. Ce sang incoagulable est centrifugé immédiatement à 1.800 tours pendant 5 min.

On laisse un autre échantillon de sang coaguler normalement.

On pratique les examens suivants :

1° *sur le plasma :*

temps de Quick,
temps de Howell,

test de tolérance à l'héparine : pour ce test, nous pratiquons la méthode décrite, en France, par SOULIER (120).

Nous modifions seulement la prise d'essai : 0,10 cm³ de plasma de cobaye, au lieu de 0,5 cm³ de plasma humain.

La solution mère d'héparine est obtenue en ajoutant 10 cm³ de solution calcique dans le flacon renfermant 1 mg. d'héparine sèche Choay.

Après de nombreux essais, nous avons pu nous arrêter à ces chiffres pour le test de tolérance à l'héparine chez les cobayes normaux.

Dilutions d'héparine.....	I	II	III
U. I. par 0,1 cm ³	0,06	0,14	0,2
Temps.....	3' 30'' à 4'	4' 30'' à 5'	6' 30'' à 8'

Ces tests de coagulation doivent être effectués dans les 3 à 4 heures

2° *sur le sérum* : titrage de l'alexine en unités d'hémolyse 50 %
(qui suivent le prélèvement.

Traitement au tromexane.

On administre, par voie orale, un demi-comprimé de tromexane, délayé dans 1 cm³ d'eau, à chaque cobaye, 2 fois par jour. Ceci, durant 2 jours, ce qui représente 600 mg. de tromexane.

Le 3^e jour, on donne seulement un demi comprimé à 10 h. 30.

Entre midi et 14 heures, deux des cobayes meurent (n^{os} 22 et 29). On arrête alors le traitement : ce qui représente une ingestion de 750 mg. d'anticoagulant.

Les cobayes survivants sont ponctionnés 24 h. après la dernière ingestion de tromexane.

Au moment de la ponction, le cobaye 18 présente une hémorragie rectale.

Les cobayes ne survivent pas à la ponction cardiaque.

On pratique à nouveau les examens suivants :

1° *sur le plasma* : tests de coagulation (il est intéressant de remarquer que le volume globulaire du sang incoaguable est diminué).

Les temps sont considérablement allongés, comme on peut le constater en examinant les chiffres groupés dans le tableau 21.

Dans le cas du test de tolérance à l'héparine, il n'est pas possible de définir un temps : la fibrine forme un voile au fond du tube et il ne se forme pas de coagulum. Ces résultats confirment l'état d'hypo-coagulabilité.

Pour les cobayes 27 et 28, on arrive à déterminer un temps, avec la dilution d'héparine la plus faible.

Cobayes	Dilution 1	
	après traitement	avant traitement
27	13'	3' 30''
28	15'	3' 45''

Résultats de nos essais.

Les résultats sont condensés dans les tableaux suivants (21, 22) :

TABLEAU 21

Action du tromexane sur la coagulation

Cobayes	Avant le traitement		750 mg. tromexane	
	Temps de Quick	Temps de Howell	Temps de Quick	Temps de Howell
18	35''	1'	indéterminable	6'
19	40''	1' 15''	2' 25''	4'
20	40''	1' 15''	8' 30''	5'
21	38''	1' 05''	indéterminable	6'
27	36''	1' 45''	3'	4'
28	30''	1' 15''	1' 50''	4'
30	29''	1'	3' 45''	7'

TABLEAU 22

Action du tromexane sur l'alexinémie

Cobayes	Alexinémie (unités 50 %)	
	Avant traitement	750 mg. tromexane
18	416	384
19	526	588
20	526	666
21	400	666
27	434	434
28	500	357
30	357	357

On observe donc :

— un *allongement très net des temps de coagulation* (Quick, Howell et test de tolérance à l'héparine).

— *pas de chute parallèle de l'alexinémie.*

Dans quatre cas sur les sept observés, le titre de l'alexine n'a absolument pas varié. Dans deux cas, on note une légère augmentation et dans un cas, une légère diminution qui peuvent être imputables à des variations individuelles.

CONCLUSION

Nous n'avons donc pas observé de diminution de l'activité complémentaire, parallèlement à l'effondrement du système de la coagulation chez des cobayes traités au tromexane.

Ce résultat confirme l'opinion des auteurs qui, comme notre maître H. DIACONO ne reconnaissent pas de similitude entre la prothrombine et l'alexine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première partie de notre travail, en nous inspirant des publications les plus récentes concernant ce sujet, nous avons rappelé les caractères essentiels de ce constituant complexe du sérum qu'est l'alexine.

C'est ainsi qu'à l'heure actuelle, l'alexine apparaît comme un complexe de quatre composants bien caractérisés : C'1, C'2, C'3 et C'4. C'1, en particulier, a pu être isolé par fractionnement à l'état pur. C'est une euglobuline dont les propriétés sont bien définies. Par fractionnement on a, également, préparé, à un état voisin de la pureté, une mucoeuglobine qui possède l'activité de C'2 et C'4.

Le troisième composant n'est pas de nature protidique, c'est un phospholipide.

Ces composants ont été titrés et les résultats des titrages ont permis de différencier les compléments de diverses espèces animales.

Le complément et ses différents composants sont sensibles à l'action de certains agents, de nature physique, chimique ou biologique, qui peuvent se comporter comme des activants ou des inhibiteurs de l'activité complémentaire.

Nous avons ensuite étudié le rôle essentiel de l'alexine dans certains processus immunitaires.

Dans l'hémolyse biologique, les rapports entre alexine et hémolyse ont fait l'objet de nombreux travaux. Les progrès de l'analyse chimique permettant de pénétrer au niveau moléculaire, les auteurs modernes tendent à donner une expression mathématique du phénomène hémolytique.

Dans l'opsonisation, l'alexine se comporte comme un facteur adjuvant de la phagocytose.

La congutination ne se produit que grâce à la coopération complément-sensibilisatrice-conglutine. Selon l'opinion de certains auteurs, le test de congutination pourrait rendre des services comparables au test de fixation du complément.

Dans l'*agglutinabilité*, nous voyons apparaître le rôle protecteur que le complément exerce sur les hématies.

Le problème de l'origine de l'alexine n'a pas encore trouvé de solution acceptable : en dehors de l'origine leucocytaire, on a pu se demander si des organes tels que la rate et le foie ne pouvaient produire de l'alexine, ou bien encore, si le système réticulo-endothélial n'intervenait pas dans l'élaboration de l'alexine.

Quant au rôle physiologique de l'alexine, nous ne savons rien de précis, si ce n'est son influence dans la physiologie du leucocyte.

Avant de terminer, nous avons considéré un autre aspect de l'activité complémentaire du sérum, celui de son rapport avec la coagulation. Nous avons signalé, quelques-uns des nombreux travaux consacrés à l'hypothèse d'une identité entre prothrombine et alexine.

La seconde partie de notre travail est consacrée à la détermination quantitative de l'alexinémie.

Tout d'abord, nous avons passé en revue les principales méthodes qui ont été proposées, qu'elles soient basées sur l'utilisation d'un système hémolytique (anti-mouton ou anti-homme) ou bien sur une méthode d'analyse chimique :

Nous proposons, ensuite, une technique permettant de déterminer l'alexinémie humaine, soit en unités d'hémolyse 100 %, soit en unités d'hémolyse 50 %.

Les caractéristiques de cette technique sont les suivantes :

- 1° Utilisation du sérum de cobaye anti-globules rouges humains ;
- 2° Dosage de l'élément le plus faible (*limiting component*) par lequel s'individualise l'alexine humaine.
- 3° Réalisation pratique d'un bon équilibre du système hémolytique en sensibilisant les hématies par la dose de sérum de cobaye anti-homme chauffé correspondant à celle-là même qui résulte de la détermination de l'index hémolytique.

Se rapportant au comportement de l'alexinémie humaine dans

certaines états pathologiques, la troisième partie de notre travail est consacrée à quelques observations que nous avons faites et à un bref aperçu de la question à la lumière de récents travaux.

Enfin, dans une quatrième partie, ne se rapportant plus directement à l'alexinémie humaine, mais à une étude générale d'un phénomène souvent associé à celui de la coagulation, nous rapportons les résultats d'une série d'essais d'ordre physiologique.

Ces essais concernent l'influence de l'héparine et du tromexane sur l'activité hémolytique.

L'héparine se comporte comme anticomplémentaire, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

La tromexane ne produit pas de changement dans l'activité du complément.

BIBLIOGRAPHIE

Les auteurs mentionnés sont tous cités dans notre travail.

1. — ALBERTY (R. A.) et DALDWIN (R. L.). — Une théorie mathématique de l'hémolyse immunologique.
J. Immunol. U.S.A., 1951, **65** n° 6, 725-35.
2. — ANDRINI (F.) et CASTRIOTA (L.). — Action des vitamines B2 et B6 sur le pouvoir complémentaire du sérum humain.
G. Batteriol. Immunol. Ital., 1949, **41** n° 4, 240-7.
3. — ANDRINI (F.) et FALSETTI (L.). — Comportement du pouvoir complémentaire du sérum humain dans les états d'acidose et d'alcalose provoqués.
Med. sper. Ital., 1949, **21**, 263-8.
4. — ANDRINI (F.) et FALSETTI (L.). — Influence du système réticulo-endothélial sur le pouvoir complémentaire du sérum.
Patol. sper. Ital., 1950, **38**, 279-84.
5. — AUBEL-LESURE (G. Mme). — Sur l'influence du complément dans l'agglutination des hématies.
C. R. Soc. Biol., 1950, **144**, n° 7-8, 472-4.
6. — AUBEL-LESURE (G. Mme). — Sur l'inhibition de l'agglutination par le complément.
Ann. pharm. Fr., 1951, n° 7-8, 525-40.
7. — BACCAREDDA (A.). — Recherches concernant l'influence des vitamines sur le pouvoir complémentaire et hémolytique total du sérum. Effets de fortes doses de vitamine D2 et de vitamine H1.
Acta vitaminol. Ital., 1948, **2** n° 5, 99-100.
8. — BEGEY (A. B.). — Pouvoir complémentaire du sérum sanguin dans quelques dermatoses.
G. Batteriol. Immunol. Ital., mars 1948, **38**, 273-84.
9. — BERGONZINI (M.). — Action des sulfamides sur les anticorps et sur le complément du sérum.
Boll. soc. ital. Biol. sper., mai-juin 1941, **16**, 325-6.
10. — BERNSTEIN (R. E.). — Le complément hémolytique et l'acide ascorbique.
Nature G. B., 1950 **165**, n° 4198, 607.
11. — BERTOLI (R.), PRATI (G.) et MANICARDI (E.). — Effets de l'administration de cholestérol sur le pouvoir complémentaire chez les animaux d'expérience.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1950, **26** n° 6, 922-4.

12. — BESSEMANS. — cité dans MEERSSEMAN.
13. — BIER. — cité dans KABAT et MAYER.
14. — BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.). — Phagocytose et infections.
Hermann Editeur. Paris 1947.
15. — BORDET (J.). — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Masson 1939.
16. — BORDET (P.) et CHOME (N.). — Propriétés du sérum soumis à l'action des hautes pressions.
Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79** n° 5, 532-46.
17. — BOWMAN (W. M.), MAYER (M. M.) et RAPP (H. J.). — Recherches sur la cinétique de l'hémolyse immunologique. II. La réversibilité du complexe globules rouges-anticorps et le transfert de l'anticorps, de globule rouge à globule rouge, qui en résulte au cours de l'hémolyse.
J. exper. Med. U.S.A., 1951, **94** n° 2, 87-110. —
18. — BROOKS. — cité dans KENT (J. F.), BUKANTZ (S. C.) et REIN (C. R.).
- 19 — BUCHNER. — cité dans BORDET.
20. — CANDELA (J. L. R.) et URGOITI (L. G.). — Rôle du complément dans le diabète alloxanique.
Endocrinology U.S.A., nov. 1947, **41**, 435-6.
21. — CATHOIRE (E.). — Baisse du pouvoir alexique du sérum dans l'accès paludéen.
C. R. Soc. Biol., 1910, **69**, 562. — cité dans VARGUES.
22. — DA COSTA CRUZ. — Teneur du sérum en alexine dans la fièvre jaune.
C. R. Soc. Biol., 1929, **101**, 948. — cité dans VARGUES.
23. — DAVIS (B. D.), KABAT (E. A), HARRIS (A.) et MOORE (P. H.). — cité dans ECKER.
24. — DELAUNAY (A.) et PAGES (J.). — Complément et phagocytose.
C. R. Soc. Biol., juin 1945, **139**, 557-8.
25. — DELAUNAY (A.) et PAGES (J.). — Le complément dans la physiologie du leucocyte.
Rev. Immunol. Fr., 1946, **10** n° 1-2, 33-44.
26. — DEMANCHE (R.). — Sérodiagnostic de la syphilis. Doin, Paris, 1952.
27. — DENYS et LECLEF. — cité dans BORDET.

28. — DIACONO (H.). — L'hémolyse. Maloine. Paris, 1934.
29. — DIACONO (H.), GUILLOT (M.) et FIEHRER (A.). — Hémolyse et coagulation.
Rev. Immunol., 1950, **14** n° 5-6, 332-40.
30. — DIACONO (H.) et CASTAY (M. Mme). — Détermination de l'alexinémie humaine en unités d'hémolyse à 100 % par utilisation du sérum de cobaye anti-globules rouges humains.
C. R. Soc. Biol., 1952, **146**, n° 21-22, 1698-1700.
31. — DIACONO (H.) et CASTAY (M. Mme). — Détermination de l'alexinémie humaine en unités d'hémolyse à 50 %, par utilisation du sérum de cobaye anti-globules rouges humains.
C. R. Soc. Biol., 1952, **146**, n° 21-22, 1701-3.
32. — DOLADILHE (M.), LEGRAND (P.), MAZILLE (M.) et TOURNEUR (C.). — La stabilité des protéides d'un sérum sanguin dépend de sa teneur en alexine.
C. R. Acad. Sci. Fr., 1951, **232** n° 9, 401 3.
33. — DONZELOT (E.) et KAUFMANN (H.). — Conception générale de l'action de l'héparine sur le milieu sanguin.
L'antagonisme héparine-sympathique.
La Presse méd., 1952, **60** n° 76, 1619-20.
34. — ECKER (E. E.), PILLEMER (L.) et KUCHN (A. O.). — Résistance à la chaleur des constituants thermostables du complément.
Proc. soc. expe. Biol. New-York, oct. 1940, **45**, 115-6.
35. — ECKER (E. E.), JONES (C. B.) et KUCHN (A. O.). — Etudes sur l'adsorption du complément.
J. Immunol., fév. 1941, **40**, 83-8.
36. — ECKER (E. E.), PILLEMER (L.) et SEIFTER (S.). — Recherches immuno-chimiques sur le sérum humain. — I. Le complément et ses constituants.
J. Immunol., sept 1943, **47**, 181-93.
37. — ECKER (E. E.), PILLEMER (L.) et SEIFTER (S.). — Recherches immuno-chimiques sur le sérum humain. — II. Etudes in vitro sur la stabilité du complément humain et de ses constituants.
J. Immunol., sept 1943, **47**, 195-204.
38. — ECKER (E. E.), SEIFTER (S.) et DOZOIS (F. F.). — Le complément dans les maladies infectieuses chez l'homme.
J. Clin. Invest. U.S.A., nov. 1946, **25**, 800-8.
39. — ECKER (E. E.) et LOPEZ-CASTRO (G.). — Le complément et le pouvoir opsonique du sérum humain frais.
J. Immunol. U.S.A., fév. 1947, **55**, 169-81.

40. — ECKER (E. E.). — Le complément.
Ann. Rev. Microbiol. U.S.A., 1948, **2**, 255-68.
41. — EHRLICH et SACHS. — cité dans BORDET.
42. — FLOSDORF et MUDEL. — cité dans DEMANCHE.
43. — FUCHS. — cité dans BORDET.
44. — GAUDEAU. — cité dans MEERSSEMAN.
45. — GENGOU (O.). — Le citrate sodique et les phénomènes d'adsorption.
Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79** n° 5, 628-39.
46. — GENGOU (O.). — Calcium et alexine.
Ann. Inst. Pasteur, 1952, **83** n° 5, 561-75.
47. — GERMAN (A.) et BORY (J.). — Emploi du sérum de cobaye anti-humain dans les réactions d'hémolyse.
Ann. pharm. Fr., 1950, **8**, 494.
48. — GORDON, WHITCHEAD et WORMALL. — cité dans BORDET.
49. — GORDON (J.). — L'action de l'ammoniaque sur le complément dans la phase inactive, avec de fortes concentrations de chlorure de sodium.
Brit. J. exper. Pathol., 1951, **32** n° 5, 442-3.
50. — GORDON. — cité par ECKER et par BORDET.
51. — GOUSSEV. — cité dans MEERSSEMAN.
52. — HANSSON. — cité dans VARGUES.
53. — HAZEN (H. L.). — Action de la température d'inactivation du sérum humain, de lapin et de cobaye, sur l'activité hémolytique du complément.
J. Immunol., mai 1943, **46**, 341-6.
54. — HECHT (H.). — L'inactivation du sérum par chauffage détruit définitivement le chaînon terminal du complément.
Rev. fr. sérol. chimiothérap., oct. 1947, **2**, 34-6.
55. — HEGEDUS (A.) et GREINER (H.). — cité dans KABAT et MAYER.
56. — HEIDELBERGER (M.). — Etudes chimiques quantitatives sur le complément ou alexine. — I. Description d'une méthode.
J. exper. Med., juin 1941, **73**, 681-94.
57. — HEIDELBERGER (M.) et MAYER (M.). — Recherches quantitatives sur le complément ou alexine. — IV. Addition de complément humain aux précipités spécifiques.
J. exper. Med., mars 1942, **75**, 285-95.

58. — HEIDELBERGER (M.). — Conférence de l'Académie nationale des Sciences sur le complément.
Proc. nation. Acad., Sci. U.S.A., 1951, **37** n° 3, 185-9.
59. — HOLE et COOMBS. — Le phénomène de la congglutination.
J. Hyg. 45, 480-9. — cité dans RICE (109).
60. — JONSEN (J.), MANSKI (W.) et HEIDELBERGER (M.). — Le complément de porc et son fractionnement pour la production de réactifs contenant le troisième composant.
J. Immunol. U.S.A., 1951, **67** n° 5, 385-91.
61. — JORDAN (F. L. J.). — Un nouveau test hépatique pour lequel 0,1 ml de sérum suffit.
Sem. Hôpitaux, 1953, **1**, E 27-29.
62. — KABAT et MAYER. — Experimental immunochemistry. 1948. Ch. Thomas, éditeur. Springfield. Illinois U.S.A.
63. — KENT (J. F.), BUKANTZ (S. C.) et REINER (C. R.). — Etudes sur la fixation du complément. — I. Titrage du complément au spectrophotomètre. Construction de graphiques pour la détermination directe de l'unité 50 %.
J. Immunol. U.S.A., mai 1946, **53**, 37-50.
64. — KENT (J. F.). — Etude quantitative de la relation complément-hémolyse.
Science U.S.A., 1947, **105**, 316.
65. — KOLLER (F.), LOELIGER (A.) et DUCKERT (F.). — Le facteur VII.
Rev. Hématol., 1952, **7** n° 2, 156-67.
66. — KOSSOVITCH (N.), ILINE (V.) et COULON (G.). — Mécanisme de l'hémolyse spécifique et rôle des différentes fractions du complément.
C. R. Soc. Biol., mars 1944, **138**, 170-1.
67. — KOSSOVITCH (N.). — Rôle respectif des protéides et des lipoides du complément dans l'hémolyse et dans quelques immunoréactions.
C. R. Soc. Biol., mai 1945, **139**, 479-80
68. — KOURILSKY (R.) et DRILHON-CORRE (Mme A.). — Recherches sur les variations de la teneur du sang en alexine dans différentes conditions physiologiques et pathologiques.
Rev. Trav. Inst. nation. Hyg. Fr., 1948, **3** n° 2, 405-15
69. — LANDSTEINER. — cité dans BORDET.
70. — LAPORTE (R.) et HARDRE DE LOOZE (L.). — Sur les différences qualitatives des sérums hémolytiques.
C. R. Soc. Biol., 1948, **142**, 489-91.

71. — LECOMTE DE NOUY (P.). — La température critique du sérum.
Act. scient. et indust. — Paris, HERMANN, 1936.
72. — LIAN (C.), SIGUIER (F.), WELTI (J. J.), PIETTE (M.), POULLAIN (P.) et PHILIPPON (J.). — Propriétés pharmacologiques et effets physiologiques d'un nouvel anticoagulant: l'ester éthylique de l'acide di-3 3' (4 - oxycoumarinyl) acétique.
Sem. Hôpitaux Paris, 1951, **35**, 1505-11.
73. — LIEFMAN et COHN. — cité dans BORDET.
74. — LIGAS (A.). — Recherches expérimentales sur les rapports entre photosensibilisation et pouvoirs immunisants. Pouvoir complémentaire et pouvoir bactéricide du sang.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1946, **22**, 1201-3.
75. — LI VOTI (P.) et MUTOLO (V.). — Contribution à l'étude des relations entre prothrombine et complément.
G. Batteriol. Immunol. Ital., 1949, **40** n° 2, 125-32.
76. — LUMIÈRE et COUTURIER. — cité par DIACONO (28).
77. — MALTANER (F.) et O. DE ALMEIDA (J.). — Les effets parallèles du magnésium sur l'activité du complément et l'activité coagulante du sérum.
Blood U.S.A., 1949, **4** n° 6, 728-33.
78. — MANN (F. D.) et HURN (H.). — Relation du complément et de la coagulation sanguine.
Proc. soc. exper. Biol. Med. U.S.A., janvier 1948, **67**, 83-5.
79. — MAYER (M. M.), EATON (B.B.) et HEIDELBERGER (M.). — Etalonnage du complément au spectrophotomètre pour les épreuves de fixation.
J. Immunol. U.S.A., mai 1946, **53**, 31-5.
80. — MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). — Action activante du magnésium et d'autres cations sur la fonction hémolytique du complément.
J. exp. Med. U.S.A., déc. 1946, **84**, 535-48.
81. — MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). — Etude quantitative de la fixation du complément.
Proc. soc. exp. Biol. Med. U.S.A., mai 1947, **65**, 66-8.
82. — MAYER (M. M.), CROFT (C. C.) et GRAY (M. M.). — cité dans HEIDELBERGER (58).
J. Exper. Med., 1948, **88**, 427.
- 83 — MEERSSEMAN (F.) et PERROT (H.). — Le pouvoir alexique des sérums humains à l'état normal et pathologique.
Rev. Immunol., juillet 1937, **3**, 354-75.

84. — MESSERLIN (A.) et LÉVÊQUE (J.). — Conservation des hématies par un dérivé de la phénothiazine.
Sem. médicale, 22 déc. 1952, 853-6.
85. — METCHNIKOFF. — cité dans BORDET.
86. — MICHELE (G. de) et PORTELLA (A.). — Pouvoir complémentaire du sérum de lapin normal soumis à un traitement par la streptomycine.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1949, **25** n° 4-5, 453-5.
87. — MILLA (E.) et CASTEGNARO (M.). — Nouvelles données sur le problème des rapports entre la prothrombine et le complément. Contribution expérimentale.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1949, **25** n° 6, 682-6.
88. — MILLA (E.) et ORIANI (L.). — Le comportement du fibrinogène chez les cobayes traités par le dicoumarol.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1949, **25** n° 6, 686-90.
89. — MORRIS (M. C.). — Quelques aspects quantitatifs de l'hémolyse immunologique.
J. Immunol. U.S.A., 1949, **62** n° 2, 201-2.
90. — MUIR. — cité dans ECKER (40).
91. — MUTSAARS (W.). — Recherches concernant l'alexine. — I. Résistance au chauffage du chaînon moyen fixé sur les globules rouges sensibilisés. — II. De l'existence des antialexines.
Ann. Inst. Pasteur, av. 1947., **73**, 379-89.
92. — MUTSAARS (W.) et BARTHELIS-VIROUX (J.). — Recherches sur un facteur favorisant la destruction du troisième composant du sérum chauffé de cobaye par le venin de cobra.
Ann. Inst. Pasteur, mai 1947, **73**, 451-71.
93. — NATHAN. — cité dans MUTSAARS.
94. — NIGRO (T.). — Vitamine K et défense humorale. Recherches expérimentales.
Acta vitaminol. Ital., 1949, **13** n° 6, 255-6.
95. — NIGRO (T.). — Vitamine K et défense humorale. Recherches expérimentales.
Acta vitaminol. Ital., 1950, **4**, n° 2, 69-71.
96. — OLHAGEN (N. B.). — cité dans ECKER (40).
Acta med. Scan.d., Suppl. 162. 1945
97. — OWREN (P.). — La proconvertine.
Rev. Hématol., 1952, **7** n° 2, 147.

98. — PAOLA (F. Donato di) et GEMMI (M.). — Sur le comportement du pouvoir complémentaire du sérum au cours du traitement par la streptomycine.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1948, **24** n° 7, 856-7.
99. — PECK (J.) et THOMAS (L.). — Etudes sur l'hémolyse des érythrocytes humains par complément homologue en présence d'acide tannique.
Bull. Johns Hopkins Hosp. U.S.A., 1949, **84** n° 3, 216-37.
100. — PILLEMER (L.), SEIFTER (S.) et ECKER (E. E.). — Action des solvants des lipides sur le quatrième composant du complément.
Proc. soc. exper. Biol. New-York, oct. 1940, **45**, 130-1.
101. — PILLEMER (L.), SEIFTER (S.), FEYCHU et ECKER (E. E.). — La fonction des composants du complément dans l'hémolyse due à l'immunité.
J. Exp. med., juillet 1942, **76**, 93-101.
102. — PILLEMER (L.). — Progrès récents dans la chimie du complément.
Chem. Rev., août 1943, **33** 1-26.
103. — POHL (A. W.) et RUTSTEIN (D. O.). — La dégradation de l'activité du complément dans le sérum humain normal.
J. Clin. Invest. U.S.A., mars 1944, **23**, 177-80.
104. — RANQUE (J.). — Contribution à l'étude de l'alexine. Thèse de médecine. Marseille, 1942.
105. — REINER et FISCHER. — cité dans PECK et THOMAS.
106. — RICE (C. E.) et BOULANGER (P.). — Note sur les variations saisonnières du taux du complément du sérum de cobaye.
Canad. J. comp. Med., 1950, **14** n° 9, 296-7.
107. — RICE (C. E.). — Interchangeabilité des composants du complément des différentes espèces animales. Revue bibliographique.
Canad. J. comp. Med., 1950, **14** n° 12, 369-79.
108. — RICE (C. E.) et BOULANGER (P.). — Etudes parallèles du complément et de la coagulation.
Canad. J. Res. sect. E, 1950, **28** n° 6, 262-70.
109. — RICE (C. E.). — Interchangeabilité des composants du complément des différentes espèces animales. — III. Dans la congélation.
J. Immunol. U.S.A., 1950, **65** n° 5, 499-507.
110. — RICE (C. E.) et BOULANGER (P.). — Interchangeabilité des composants du complément des différentes espèces animales. — IV. Dans l'hémolyse des globules rouges de lapin avec antisérum mouton.
J. Immunol. U.S.A., 1952, **68** n° 2, 197-205.

111. — ROBINEAUX (R.). — Sur le rôle du complément dans la physiologie du leucocyte humain.
Le Sang, 1950, n° 9, 791-800.
112. — RONCHESE. — cité dans DEMANCHE.
113. — RONDONI (P.). — Nature et constitution du complément.
Boll. Ist. sieroterap. milanese, 1950, **29** n° 1-2, 1-5.
114. — ROULIER (P.). — Sur les facteurs favorisant l'hémolyse biologique, contenus dans le sérum humain inactivé par chauffage à 56°.
C. R. Soc. Biol., 1948, **142**, 128-31.
115. — ROULIER (P.). — Sur une réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 % d'hémolyse. — Thèse de médecine. Montpellier, 1951.
116. — SCARTOZZI (C.). — Le pouvoir complémentaire. Méthodes de dosage.
Giorn. Batt. e Immun., 1937, **18**, 721.
117. — SCARTOZZI (C.) et GRIVA. — Le pouvoir complémentaire dans la tuberculose.
Giorn. Batt. e Immun., 1937, **18**, 766.
118. — SCARTOZZI (C.). — Le pouvoir complémentaire dans certains états physiologiques et pathologiques chez l'homme.
Giorn. Batt. e Immun., 1937, **19**, 797.
119. — SICE (A.). — Recherche sur le pouvoir flocculant des trypanosomes.
Bull. soc. Path. exo., 1929, **22**, 912. Cité dans Vargges.
120. — SOULIER (J. P.) et LE BOLLOCH (A. G.). — Le test de tolérance à l'héparine in vitro.
Rev. Hématol., 1950, **2**, 148.
121. — STAVITSKY (A. B.), STAVITSKY (R.) et ECKER (E. E.). — Baisse de l'activité hémolytique du complément et du taux des granulocytes après réinjection d'un antigène au lapin.
J. Immunol. U.S.A., 1949, **63** n° 4, 389-407.
122. — STRANO (A.). — Action des acides aminés sur le pouvoir complémentaire du sérum.
Med. sper. Ital., 1949, **21**, 269-72.
123. — STRENG. — cité dans BORDET.
124. — TODA et MITSUSE. — cité dans BORDET et dans RONDONI.
125. — THOMPSON. — cité dans VARGUES.

126. — VAN DER SCHRIECK (H. G.) et VAN GOIDSENHOVEN (G.). — L'action des ultrasons sur quelques liquides organiques. Etude sur le sérum, l'hémolysine, les agglutinines et l'alexine.
Rev. belg. Pathol. Med. exper., 1950, **20** n° 3, 188-94.
127. — VARGUES (R.). — Etude de l'alexinémie au cours des maladies infectieuses.
Thèse de médecine. Alger, 1947.
128. — VARGUES (R.). — Etude sérologique de l'infection expérimentale du rat blanc par *Plasmodium berghei*: disparition de l'alexine; présence d'anticorps fixant le complément.
C. R. Soc. Biol., 1951, **145**, n° 15-16, 1.134.
129. — VARGUES (R.), FABIANI (G.) et FULCHIRON (G.). — Etude sérologique de l'infection expérimentale du rat blanc par *Plasmodium berghei*. Variations quantitatives de la sensibilisatrice et de l'alexine au cours de la maladie.
C. R. Soc. Biol., 1951, **145** n° 17-18, 1298-300.
130. — VON KROGH. — cité dans WADSWORTH.
131. — WADSWORTH (A.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — Etude quantitative de la réaction de fixation du complément par un sérum immun et un antigène.
J. Immunol., 1931, **21**, 313.
132. — WRIGHT et DOUGLAS. — cité dans BORDET.
133. — ZERMATI (M.) et VARGUES (R.). — Concentration alexique du sang au cours du paludisme aigu.
C. R. Soc. Biol., 1947, **141**, 406-7.
134. — ZERMATI (M.) et VARGUES (R.). — Variations de la concentration alexique du sérum au cours du paludisme aigu.
Ann. Med. Fr., 1947, **48** n° 3, 245-70.
135. — ZERMATI (M.), VARGUES (R.) et LEWY (M.). — Etude de l'agglutinabilité des hématies par les sérums antagonistes chez les sujets normaux et malades.
C. R. Soc. Biol., 1947, **141**, 877.
136. — ZACCO (M.). — Contribution expérimentale à l'étude de l'alexine.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1947, **23**, 629-31.
137. — ZACCO (M.) et PRATESI (G.). — Pouvoir complémentaire et teneur en histamine du sérum.
Boll. soc. ital. Biol. sper., 1947, **23**, 631-3.
-

« MONTPELLIER, le 4 Juin 1953.

VU : *le Doyen :*

(Signé) : E. CANALS. »

« VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

MONTPELLIER, le 4 Juin 1953.

Le Recteur :

(Signé) : P. GUILLON. »

